

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS
Departamento de Física del Estado Sólido



TESIS DOCTORAL

Estructura de membranas biológicas mediante difracción de rayos X a ángulos bajos : aplicación al caso de la membrana púrpura del halobacterium halobium

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Enrique López Cabarcos

Madrid, 2015

TP
1984
045

Enrique López Cabarcos



* 5 3 0 9 8 6 3 1 6 8 *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x-53-031486-9

ESTRUCTURA DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS MEDIANTE DIFRACCIÓN DE RAYOS X
A ANGULOS BAJOS: APLICACIÓN AL CASO DE LA MEMBRANA PURPURA
DEL HA'OBACTERIUM HA'OBIIUM

Departamento de Física del Sólido
Facultad de Ciencias Físicas
Universidad Complutense de Madrid
1984



Colección Tesis Doctorales. Nº 45/84

© Enrique López Cabarcos
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1984
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-5894-1984

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS FISICAS
Departamento de Física del Estado Sólido

ESTRUCTURA DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS MEDIANTE DIFRACCIÓN
DE RAYOS-X A ÁNGULOS BAJOS: APLICACIÓN AL CASO DE
LA MEMBRANA PURPURA DEL HALOBACTERIUM HALOBIIUM

Memoria presentada por
ENRIQUE LOPEZ CABARCOS
para optar al grado de
Doctor en Ciencias Físicas
Madrid, 1981

Director:
Salvador Fernández Bermúdez
Colaborador Científico del C.S.I.C.

I

INDICE

| | |
|---|----|
| PROLOGO | 1 |
| 1. INTRODUCCION | 7 |
| 1.1. Análisis de los diagramas de difracción de Rayos-X de membranas biológicas | 8 |
| 1.1.1. Descripción del objeto difractante | 10 |
| 1.1.2. Amplitud de la onda difractada | 13 |
| 1.1.3. Formalismo de la función $Q(x)$ | 17 |
| 1.1.4. Construcción de $Q(x)$ modelo | 19 |
| 1.2. Estados de la materia de orden intermedio: Paracrístales | 22 |
| 1.2.1. Estructuras paracrístalinas | 22 |
| 1.2.2. Modelo paracrístalino de empaquetamiento de membranas | 29 |
| 1.3. Empaquetamiento de fibrillas | 34 |
| 1.4 Membrana Púrpura de Halobacterium Halobium: Estructura y Función | 38 |
| 1.4.1. Antecedentes | 38 |
| 1.4.2. Objetivos de este trabajo | 46 |
| 2. EXPERIMENTAL | 55 |
| 2.1. Cultivo de Halobacterium Halobium y preparación de Membrana Púrpura | 56 |
| 2.1.1. Cultivo de Halobacterium Halobium | 56 |
| 2.1.2. Preparación de Membrana Púrpura | 56 |
| 2.2. Geometría de la cámara de difracción a bajo ángulo | 57 |
| 2.3. Análisis de los perfiles de difracción | 63 |
| 2.3.1. Estudio de la forma de los perfiles | 64 |

II

| | |
|--|-----|
| 2.3.2. Determinación de la posición de las reflexiones | 65 |
| 2.3.3. Medida de la intensidad difractada | 67 |
| 2.3.4. Corrección por los factores de polarización y Lorentz | 68 |
| 3. RESULTADOS | 71 |
| 3.1. Descripción del diagrama de difracción de la Membrana Púrpura | 72 |
| 3.2. Análisis en la dirección ecuatorial | 76 |
| 3.2.1. Parámetros de la celdilla unidad | 76 |
| 3.2.2. Tamaño y perfección de los microcristales de Membrana Púrpura | 83 |
| 3.2.3. Distribución de Bacteriorrodopsina en la Membrana Púrpura. Justificación de la intensidad difractada en la dirección ecuatorial | 88 |
| 3.3. Análisis en la dirección meridional | 98 |
| 3.3.1. Apilamiento imperfecto. Tamaño de los paquetes de la Membrana Púrpura | 99 |
| 3.3.2. Cálculo de la función $Q(x)$ y del perfil de densidad electrónica | 102 |
| 4. DISCUSION | 114 |
| 4.1. Discusión de los parámetros de celdilla calculados | 115 |
| 4.2. Naturaleza paracristalina de la Membrana Púrpura | 118 |
| 4.2.1. Distorsiones en el plano de la Membrana | 118 |
| 4.2.2. Distorsiones de empaquetamiento | 121 |
| 4.3. Distribución de Bacteriorrodopsina en la Membrana Púrpura | 123 |
| 4.4. Perfil de densidad electrónica de la Membrana Púrpura | 125 |
| 5. CONCLUSIONES | 131 |

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis ha sido realizada en el laboratorio de Física Macromolecular del Instituto de Estructura de la Materia del CSIC, bajo la dirección del Dr. D. Salvador Fernández Bermúdez al que expreso mi agradecimiento por la dirección de la misma.

Deseo también expresar mi agradecimiento al Dr. D. Francisco J. Baltá Calleja, Jefe del Laboratorio de Física de Macromoléculas y al Prof. D. Enrique Otero Aenlle, Director del Departamento de Físico-Química de la Facultad de Farmacia por su gran interés y ayuda en la realización del trabajo.

Al Dr. D. José González Rodríguez su gran colaboración en el suministro de Membrana Púrpura.

Al Dr. E.H. Pape su colaboración prestada en la programación de los cálculos.

A la Sra. M.E. Montesinos Huici por el cuidadoso mecanografiado realizado.

Al Prof. Cayetano Serna por haber aceptado ser el ponente de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio y facultad, y a todos los que de una u otra forma han colaborado para que este trabajo haya podido llevarse a cabo.

1

PROLOGO

•

•

El descubrimiento por M. von Laue en 1912 de la difracción de Rayos X por cristales seguido de los estudios hechos por W.H. Bragg y W.L. Bragg en sales inorgánicas sencillas fué el punto de partida de las técnicas de difracción extendidas posteriormente a electrones y neutrones. Su aplicación a la determinación de estructuras en los campos de la Física, Química, Geología y Mineralogía quizás logra sus resultados más espectaculares al conseguir resolver de talladamente la estructura de complejos macromoleculares de interés biológico tales como proteínas, enzimas y ácidos nucleicos. A la vista de este éxito de las técnicas de difracción en el campo de la Biología Molecular resulta sorprendente la poca atención prestada a los estudios estructurales mediante difracción de membranas celulares como la membrana citoplasmática, membrana nuclear y membranas de órganos celulares. Probablemente la visión que la microscopía electrónica proporcionó de las células y sus componentes, entre ellas las membranas, presentaba a éstas con una morfología consistente con los modelos existentes al respecto, guarda relación con el retraso con que empezaron a usarse técnicas de difracción en este área de investigación. Otra razón por la que no se han usado técnicas de difracción, puede ser debida a la complejidad y variedad de composición y organización que presentan estos sistemas, y lo que quizás sea más importante a la incapacidad de obtener cristales macroscópicos de membrana del tamaño apropiado para poder ser analizados mediante difracción.

Ante esta situación y dado que la información que puede obtenerse con estas técnicas depende en gran parte del grado de orden o la existencia de estructuras periódicas en las muestras, se comenzó por estudiar aquellas membranas que ya en condiciones naturales se presentan organizadas en multicapas como es el caso de la mielina.

del nervio, los segmentos abastados de la retina, los cloroplastos y las membranas mitocondriales. Sin embargo, esta ordenación en multicapas no puede generalizarse al resto de las membranas, por ejemplo, todas las membranas citoplasmáticas, por lo que su estudio debe hacerse entonces a partir de empaquetamientos artificiales de las mismas no siempre fáciles de conseguir y mejorar dependiendo la información que se obtiene del grado de orden que se consiga en estos apilamientos. Por otra parte las membranas no son estructuras estáticas sino por el contrario sus moléculas presentan una cierta movilidad y aparecen generalmente en disposiciones que no están totalmente ordenadas, distantes de lo que es un cristal perfecto. No se supone que el término desordenado tenga que ver con un modelo universal de estructura y en tales casos es necesario una descripción cuantitativa del grado de desorden tanto en el interior de las membranas como en los apilamientos de las mismas. Hosemann y Bagchi en 1962 ofrecen una descripción exhaustiva de estos estados de la materia de orden intermedio a los cuales denominaron "paracrystalos". Definen dos clases de desorden: desorden de primera especie que se refiere a sistemas en los que se mantiene el orden a largo alcance como en el caso de las vibraciones térmicas en un cristal, y desorden de segunda especie o paracrystalos, en los que se pierde el orden de largo alcance quedando sólo orden a corto alcance. El concepto de desorden laminar de segunda especie asociado al empaquetamiento parece el tratamiento adecuado para describir el apilamiento de membranas. Así han sido descritas como empaquetamientos paracrystalinos los de la mielina del nervio (2-6), fibra de colágeno (7), membrana de eritrocito (8), membranas mitocondriales (9) y otras.

El tratamiento de la intensidad registrada en el diagrama se hace a partir de modelos en los que las moléculas se disponen en agrupaciones conocidas. A partir de un modelo establecido se trata de reconstruir el diagrama de difracción. Los parámetros del modelo se modificaron en base a este criterio. La dificultad de relacionar un modelo y avanzar en los cálculos aumenta a medida que crece el desorden de la muestra. Esto es especialmente cierto para la reconstrucción de la distribución de proteínas y lípidos en el plano de la membrana así como a lo largo de la sección transversal de la misma cuya proyección sobre el eje de apilamiento es lo que calculamos y se conoce con el nombre de perfil de densidad electrónica de la membrana.

En los primeros trabajos de Finean y Burge (1963) (10), Worthington y Blaurock (1968) (11) y Worthington (1969) (12), los perfiles de densidad electrónica se representaban mediante modelos de escalones rectangulares de altura y anchura dadas que se hacen corresponder con regiones características en la membrana como grupos de cabezas polares de lípidos, cadenas hidrocarbonadas de los lípidos, grupos de proteínas, y regiones entre membranas. Tales modelos de pasos implicaban la existencia de discontinuidades en el perfil de densidad. Los trabajos de Kreutz (1970) con membranas fotosintéticas (13) y Corless (1972) en membranas de las células abastionadas de la retina (14) muestran que estos modelos de pasos no son los más apropiados para describir el perfil de las membranas biológicas. Levine (1973) señala que aunque la transformada de Fourier de tales modelos puede calcularse fácilmente, se requiere un número muy grande de reflexiones en el diagrama de difracción para poder reconstruir las discontinuidades (15). Esto representa una seria desventaja,

pues en los empaquetamientos de membranas no aparecen nunca más allá de diez reflexiones. La elección de una distribución de funciones gaussianas, a la hora de construir el modelo, elimina el problema de la discontinuidad en el perfil de densidad electrónica de la membrana a la vez que facilita el cálculo de los productos de convolución que aparecen en el desarrollo del modelo. Los métodos de difracción ya que no son destructivos para este tipo de estructuras proporcionan una información valiosa acerca de las membranas biológicas en condiciones cercanas a las naturales.

Como objeto de estudio en este trabajo hemos escogido una membrana altamente especializada; Membrana Púrpura (MP) del *Halobacterium Halobium* que tiene una estructura y función muy particulares como se verá en los capítulos siguientes. A partir de los diagramas de difracción de Rayos X se han construido modelos de distribución de la proteína en el plano de la membrana y se ha calculado el perfil de densidad electrónica. Las fluctuaciones paracrystalinas que ocurren en la membrana y en los apilamientos de membranas ofrecen una explicación satisfactoria de hechos que se observan en el diagrama de difracción como son la disminución de la intensidad y el aumento de la anchura integral de las reflexiones al aumentar el espaciado.

REFERENCIAS

1. Hosemann, R., Bagchi, S.N., "Direct Analysis of Diffraction by Matter", Amsterdam, North Holland (1962)
2. Blaurock, A.E., Nelander, J.C., J. Mol. Biol., 39, 417 (1976)
3. Hybl, A., Mol. Cryst. Liq. Cryst., 36, 271 (1976)
4. Nelander, J.C., Blaurock, J.C., J. Mol. Biol., 118, 497 (1978)
5. Hybl, A., J. Appl. Cryst., 10, 141 (1977)
6. Gbordzoe, M.K., Kreutz, W., J. Appl. Cryst., 11, 489 (1978)
7. Hosemann, R., Dseissig, W., Nemetschek, T., J. Mol. Biol., 83, 275 (1974)
8. Pape, F.H., Klott, K., Kreutz, W., Biophys. J., 19, 141 (1977)
9. Müller-Klieser, W., Kreutz, W., Z. Naturforsch., 31C, 612 (1976)
10. Finean, J.B., Burge, R.E., J. Mol. Biol., 7, 672 (1963)
11. Worthington, C.R., Blaurock, A.E., Nature (London), 218, 87 (1968)
12. Worthington, C.R., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 63, 640 (1969)
13. Kreutz, W., Adv. Bot. Res., 3, 53 (1970)
14. Corless, J.M., Nature (London), 237, 229 (1972)
15. Levine, Y.K., Prog.Surf., 3(4) 299 (1973)

7

1. INTRODUCCION

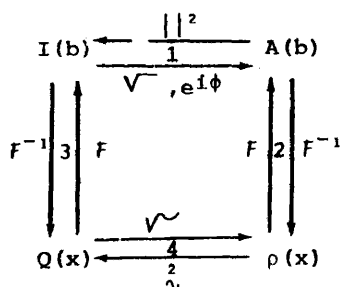
1.1. Análisis de los diagramas de difracción de Rayos-X de membranas biológicas

La preparación de membranas para su estudio mediante técnicas de difracción de Rayos-X incluye el conseguir empaquetamientos de membranas con un grado de orientación lo más alto posible. Tales apilamientos se pueden considerar como cristales unidimensionales en la dirección de empaquetamiento, siendo la celdilla unidad una membrana individual o un par de membranas según los casos.

Los Rayos X son entonces difractados debido a la distribución de densidad electrónica periódica a lo largo del eje de empaquetamiento, conocida con el nombre de perfil de densidad electrónica.

Es necesario precisar que cuando hablamos de densidad electrónica estamos hablando de diferencias de densidad electrónica con respecto al medio que se considera con densidad electrónica cero. Lo que se miden son densidades relativas y pueden tener valores positivos o negativos según la densidad electrónica de la membrana, sea mayor o menor que la del medio (1).

Existen dos caminos para calcular el perfil de densidad a partir de la intensidad observada que se resumen en el esquema siguiente:



donde $\rho(x)$ es la densidad electrónica, $A(b)$ la amplitud difractada, $Q(x)$ la función de autocorrelación o cuadrado de convolución de $\rho(x)$, F el operador de transformada de Fourier y su inversa F^{-1} , $\hat{\rho}$ es el operador cuadrado de convolución, \vec{b} es el vector en el espacio recíproco de módulo, $2 \sin \theta / \lambda$.

El procedimiento de cálculo a través de los pasos 1 y 2 se utiliza normalmente en cristalografía ya que al tener un gran número de reflexiones (hasta algunos miles), la síntesis de Fourier puede hacerse con gran aproximación. El cálculo de $\rho(x)$ a través de los pasos 3 y 4, llamado método de la función $Q(x)$ se usa normalmente en el análisis de diagramas de membranas celulares, bicapas lipídicas y membranas reticulares debido a que el número de reflexiones que aparece en estos casos suele ser pequeño (5 ó 6, alguna vez hasta diez como máximo) y la síntesis de Fourier tendría una resolución muy pobre.

La función $Q(x)$ o transformada de Fourier de la intensidad se calcula usando todos los puntos del diagrama, obteniéndose así una función que denominaremos $Q(x)$. A partir de un modelo de $\rho(x)$ se obtiene la función $Q(x)$, cuyos parámetros se refinan usando un procedimiento de mínimos cuadrados no lineal, propuesto por Marquardt (2) hasta conseguir minimizar las diferencias entre $Q(x)$ y $Q(x)$ mod.

Para comparar el grado de acuerdo entre $Q(x)$ y $Q(x)$ se usan, dependiendo de los autores (4,25) los parámetros R_q y G_q definidos de la siguiente manera:

$$R_q = \frac{\sum_{m=1}^N [Q_{\text{exp}}(xm) - Q_{\text{mod}}(xm)]^2}{[Q_{\text{exp}}(xm)]^2} \quad |1|$$

$$G_q = \frac{\sum_{m=1}^N [Q_{\text{exp}}(xm) - Q_{\text{mod}}(xm)]^2}{N} \quad |2|$$

dónde N representa el número de valores de la función $Q(x)_{\text{exp}}$ usados en el cálculo.

La solución $\rho(x)$ que minimiza las diferencias de $Q(x)_{\text{exp}}$ $Q(x)_{\text{mod}}$ será considerada la correcta.

1.1.1. Descripción del objeto difractante

El empaquetamiento de membranas puede describirse fácilmente en términos matemáticos asignando a cada una de las características esenciales del sistema una función. Correspondiendo con red, forma y motivo del objeto difractante, tres funciones bastan para describir el sistema (3):

La función de red $Z(x)$ que determina la secuencia, se define cómo:

$$Z(x) = \sum_{n=-\infty}^{n=+\infty} \delta(x - nL) \quad |3|$$

con $\delta(x) = 0$ para $x \neq 0$ y $\int_{-\infty}^{+\infty} \delta(x) dx = 1$ siendo L la constante de red.

La función de forma $S(x)$ para un paquete de tamaño D se define cómo:

$$S(x) = \begin{cases} 1 & |x| \leq D/2 \\ 0 & \text{resto} \end{cases} \quad |4|$$

La función $\rho_0(x)$ que describe la proyección de la densidad electrónica del motivo para el caso centrosimétrico y un motivo de espesor L_0 viene dada por:

$$\rho_0(x) = \begin{cases} \rho_0(x) & -L_0/2 \leq x \leq L_0/2 \\ 0 & \text{resto} \end{cases} \quad |5|$$

Una vez establecida la correspondencia entre funciones matemáticas y características del sistema descritas por éstas, se construye un modelo general del sistema difractante válido para el caso de membranas y sistemas lamelares en general.

El primer punto consiste en pasar de una secuencia infinita de puntos, red infinita, a una secuencia finita, paquete de membranas. Esto matemáticamente no es más que el producto $Z(x) \cdot S(x)$. (Ver figura 1).

El segundo punto consiste en reproducir el motivo representado por $\rho_0(x)$ alrededor de cada punto de la red, cosa que se logra con la operación de convolución.

La densidad electrónica del paquete de membranas viene dada entonces por la expresión

$$\rho(x) = \rho_0(x) * (Z(x) \cdot S(x)) \quad |6|$$

dónde el símbolo $*$ representa el producto de convolución que para dos funciones f y g se define cómo:

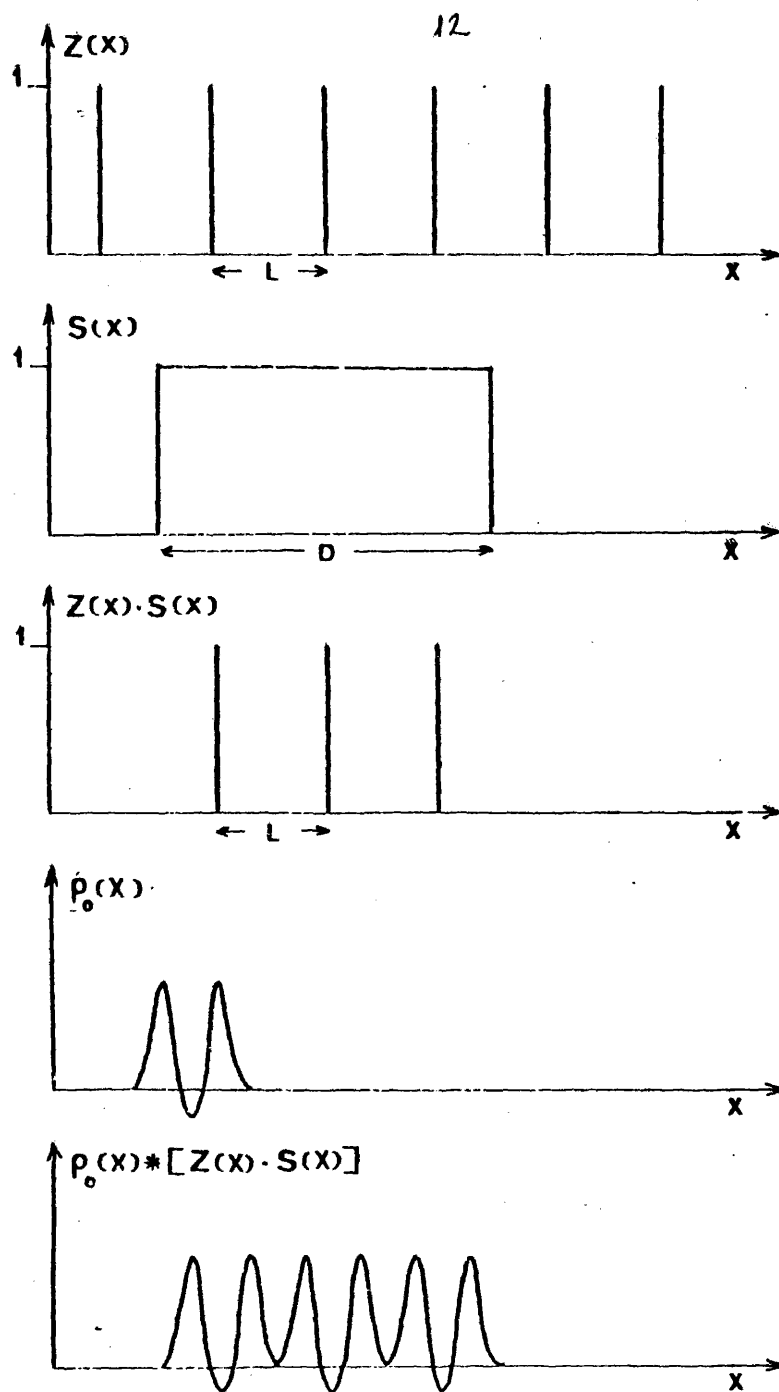


Fig. 1

$$f(x) * g(x) = \int f(x') g(x-x') dx' \quad |7|$$

Cómo puede verse en la figura 1 el objeto queda de esta manera descrito mediante estas tres funciones.

1.1.2. Amplitud de la Onda Difractada

En el proceso de difracción, cada punto de la muestra actúa como una fuente de ondas difractadas. En caso de objetos con una distribución continua de densidad electrónica, la amplitud total está dada por la integral sobre el volumen del objeto difractante:

$$A(\vec{b}) = \int_{V(x)} \rho(\vec{x}) \exp(-2\pi i \vec{b} \cdot \vec{x}) dv_x \quad |8|$$

lo que no es más que la transformada de Fourier de la distribución de densidad electrónica. Llamando F al operador transformada de Fourier lo escribimos

$$A(\vec{b}) = F \{ \rho(\vec{x}) \} \quad |9|$$

el vector \vec{b} es el vector en el espacio recíproco que se define de la siguiente manera: Si \vec{k}_0 es el vector unidad en la dirección del haz incidente de Rayos-X, \vec{k} el vector unidad en la dirección del haz difractado, \vec{x} el vector que define la posición en el espacio real de los puntos que difractan O y P, la diferencia de camino (fig. 2) entre el haz difractado en O y el difractado en P será entonces $\vec{k} \cdot \vec{x} - \vec{k}_0 \cdot \vec{x}$, a la que corresponde una diferencia de fase $(\vec{k} - \vec{k}_0) \cdot \vec{x} \approx 2\pi/\lambda$. El vector \vec{b} se define entonces como $(\vec{k} - \vec{k}_0)/\lambda$ con lo que la diferencia de fase será $2\pi \vec{b} \cdot \vec{x}$.

El módulo de \vec{b} viene dado por $|\vec{b}| = 2 \sin \theta / \lambda \approx 2\theta / \lambda$ para

1h

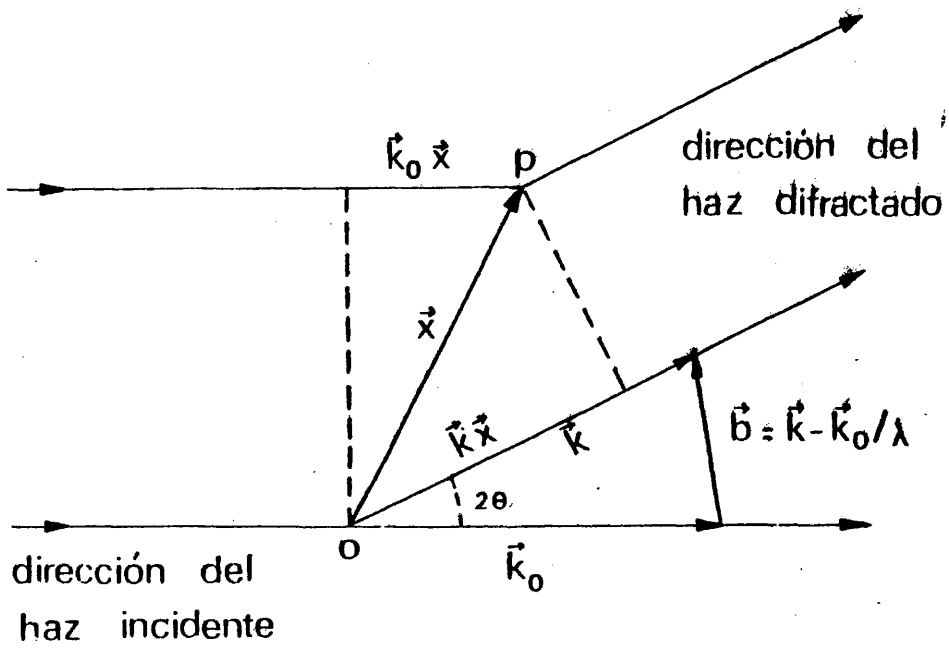


Fig. 2

el caso de ángulos bajos, siendo la λ la longitud de onda de los Rayos-X y θ el ángulo de Bragg.

La amplitud de la onda difractada por el paquete de membranas se relaciona con las tres funciones que describen la distribución de densidad electrónica en el objeto, sustituyendo en la ecuación |9| $\rho(x)$ por su valor, dado en la ecuación |6|.

$$A(b) = F\{\rho_0(x) * (Z(x) \cdot S(x))\} \quad |10|$$

Si llamamos

$$\begin{aligned} F\{\rho_0(x)\} &= F(b) \\ F\{Z(x)\} &= Z(b) \\ F\{S(x)\} &= S(b) \end{aligned} \quad |11|$$

y teniendo en cuenta los teoremas de la transformada de Fourier que dicen que la transformada de Fourier de un producto de convolución de dos funciones f, g es el producto de sus transformadas

$$F\{f * g\} = F\{f\} \cdot F\{g\} \quad |12|$$

y que la transformada de un producto de dos funciones es el producto de convolución de sus transformadas de Fourier

$$F\{f \cdot g\} = F\{f\} * F\{g\} \quad |13|$$

la amplitud total de la onda difractada (figura 3), se puede expresar entonces:

$$A(b) = F(b) [S(b) * Z(b)] \quad |14|$$

y la intensidad será

$$I(b) = |A(b)|^2 = |F(b)|^2 [S(b) * Z(b)]^2 \quad |15|$$

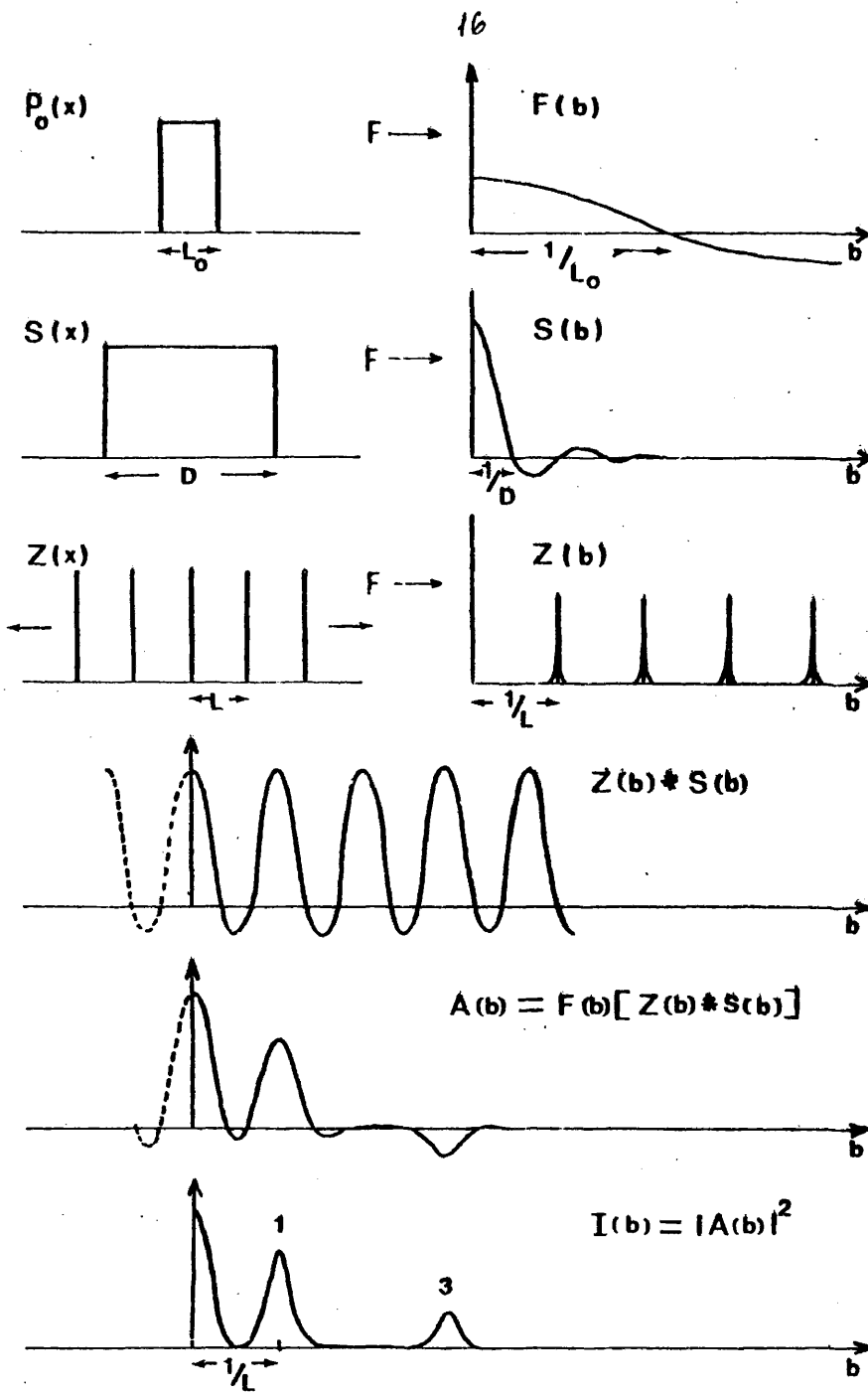


Fig. 3

1.1.3. Formalismo de la función Q(x)

En términos cristalográficos a la transformada de Fourier inversa de la intensidad difractada se la conoce como función de Patterson generalizada o función Q(x)

$$Q(x) = F^{-1}\{I(b)\} = F^{-1}\{A(b)\} * F^{-1}\{A^+(b)\} =$$

$$F^{-1}F\{\rho(x)\} * F^{-1}F\{\rho(-x)\} = \rho(x) * \rho(-x) =$$

$$\overset{2}{\sim} \rho(x) \quad |16|$$

El símbolo $\overset{2}{\sim}$ representa el cuadrado de convolución.

Teniendo en cuenta que para un paquete de membranas $\rho(x)$ viene dada por la ecuación |6| y aplicando los teoremas dados en las ecuaciones |12| y |13| obtenemos:

$$Q(x) = \overset{2}{\rho_0}(x) * \overset{2}{S(x)Z(x)} \quad |17|$$

es decir la función Q(x) es el cuadrado de convolución del motivo convolucionado con el cuadrado de convolución de una red finita.

Para un empaquetamiento de N-membranas (4),

$$\overset{2}{S(x)Z(x)} = \sum_{n=0}^{N-1} (N-n) \delta(x \pm nL) \quad |18|$$

con lo cual y llamando $Q_0(x)$ al cuadrado de convolución de $\overset{2}{\rho_0}$ como es la terminología habitual, se obtiene

$$Q(x) = Q_0(x) * \left\{ \sum_{n=0}^{N-1} (N-n) \delta(x \pm nL) \right\} \quad |19|$$

es decir la función Q(x) no es más que la función $Q_0(x)$ convolucio-

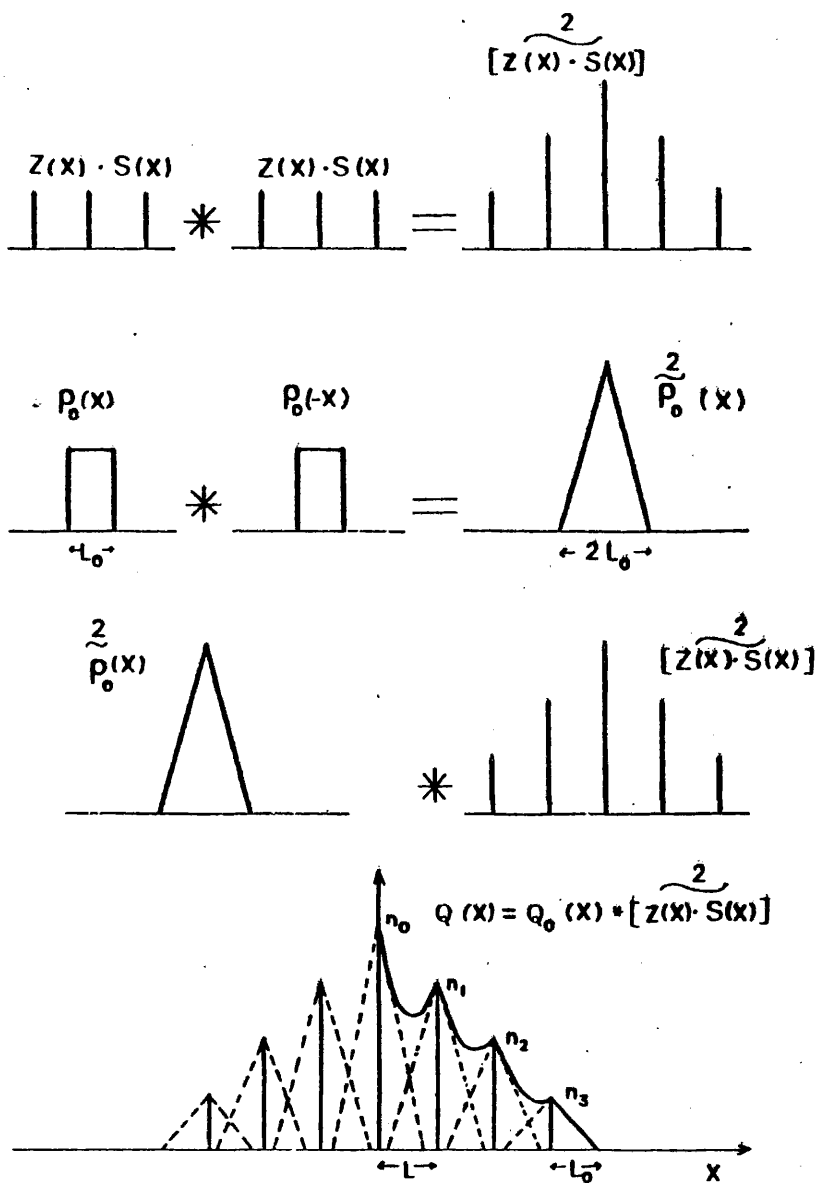


Fig. 4

nada más veces alrededor de los puntos de la red con pesos $N-n$ cómo puede verse en la figura 4.

1.1.4. Construcción de Q -modelo

La densidad electrónica de una celdilla centrosimétrica puede ponerse siempre cómo

$$\rho_0(x) = \rho_m(x) + \rho_m(-x) * \delta(x-\ell_1) \quad |20|$$

siendo $\rho_m(x)$ la densidad electrónica de una membrana o de una monocapa lipídica, según en la celdilla unidad tengamos una vesícula o una membrana respectivamente y ℓ_1 la distancia entre los centros de gravedad de $\rho_m(x)$ y $\rho_m(-x)$ dentro de la celdilla unidad (Fig. 5).

Representamos $\rho_m(x)$ cómo una suma de N_0 gaussianas de la misma anchura

$$\rho_m = \sum_{n=1}^{N_0} A_k \exp[-c(x-x_k)^2] \quad |21|$$

y usando la notación:

$$\begin{aligned} Q_m(x) &= \rho_m(x) * \rho_m(-x) \\ Q_{m_1}(x) &= \rho_m(x) * \rho_m(x) \\ Q_{m_2}(x) &= \rho_m(-x) * \rho_m(-x) \end{aligned} \quad |22|$$

la función Q_0 vendrá dada entonces cómo:

$$Q_0(x) = 2 Q_m(x) + Q_{m_2}(x) * \delta(x-\ell_1) \text{ para } x \geq 0 \quad |23|$$

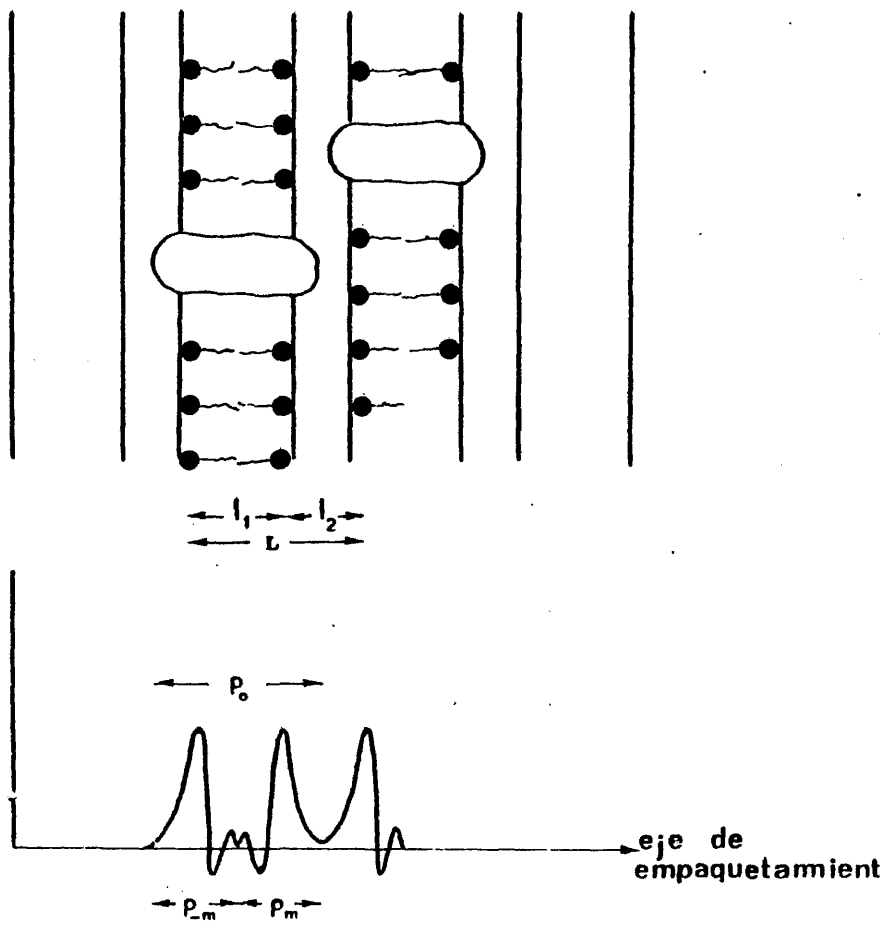


Fig. 5

Debido al carácter centrosimétrico de las funciones $Q_0(x)$ y $Q(x)$, toda la información acerca de $\rho_0(x)$ y $\rho(x)$ puede deducirse usando solamente la mitad derecha ($x \geq 0$) de las funciones $Q_0(x)$ y $Q(x)$ respectivamente.

En función de los parámetros de las gaussianas del modelo, $Q_m(x)$, $Q_{m_1}(x)$ y $Q_{m_2}(x)$, se expresan:

$$Q_m(x) = \left(\frac{\pi}{2c}\right)^{\frac{1}{2}} \sum_{i=1}^{N_0} \sum_{j=1}^{N_0} A_i A_k \exp.\{-0.5 c [x - (x_i - x_k)]^2\} \quad |24|$$

$$Q_{m_1}(x) = \left(\frac{\pi}{2c}\right)^{\frac{1}{2}} \sum_{i=1}^{N_0} \sum_{j=1}^{N_0} A_i A_k \exp.\{-0.5 c [x - (x_i + x_k)]^2\} \quad |25|$$

$$Q_{m_2}(x) = \left(\frac{\pi}{2c}\right)^{\frac{1}{2}} \sum_{i=1}^{N_0} \sum_{j=1}^{N_0} A_i A_k \exp.\{-0.5 c [x + (x_i + x_k)]^2\} \quad |26|$$

La función Q_{mod} viene dada entonces para un empaquetamiento de N membranas:

$$\begin{aligned} Q_{mod}(x) = & 2 N Q_m(x) * \delta(x-0) + N Q_{m_1} * \delta(x-l_1) + (N-1) Q_{m_2} * \\ & * \delta(x-l_2) + 2 (N-1) Q_m * \delta(x-l_1) * \delta(x-l_2) + \\ & + (N-1) Q_{m_1} * \delta(x-l_1) * \delta(x-l_2) * \delta(x-l_1) + \\ & + \sum_{n=2}^{N-1} (N-n) [Q_{m_1} * \delta(x-l_1) * \delta(x-l_2) * \delta(x-l_1) + \\ & + Q_{m_2} * \delta(x-l_2) + 2 Q_m * \delta(x-l_1) * \delta(x-l_2)] * \\ & * [\delta(x-l_1) * \delta(x-l_2)]_{n-1} \end{aligned} \quad |27|$$

siendo l_2 la distancia entre los centros de gravedad de $\rho_m(x)$ y $\rho_m(-x)$ entre celdillas contiguas, es decir $l_1 + l_2 = L$, siendo L el espaciado observable.

Es esta $Q(x)$ la que se compara con $Q(x)$ (calculada cómo mod exp la transformada de Fourier inversa de la intensidad recogida en el diagrama de difracción) y los parámetros A_i , A_k , c y x_k del modelo son los que se minimizan empleando el procedimiento de Marquard (2). El conjunto inicial de parámetros del modelo a minimizar se elige de acuerdo con la fórmula de Buerger (5) que relaciona la amplitud, posición, anchura y número de picos que aparecen en la función $Q(x)$ con la amplitud, posición y anchura de los picos en la función $\rho(x)$. Una vez minimizados, la solución ρ_0 se calcula simplemente cómo una suma de gaussianas de parámetros conocidos.

1.2. ESTADOS DE LA MATERIA DE ORDEN INTERMEDIO: PARACRISTALES

1.2.1. Estructuras Paracristalinas

Las teorías convencionales clasifican las estructuras atómicas y moleculares en agregados cristalinos y amorfos dependiendo de que exista o no un orden tridimensional de átomos o moléculas en el sólido. Sin embargo, todos los polímeros biológicos y artificiales están dentro de un grupo de sustancias que ni son cristales ni están totalmente desordenadas, sino que se comportan de una manera intermedia. La teoría del paracristal enunciada en 1950 por Hosemann (6) proporciona un marco adecuado para describir estos estados intermedios entre líquidos y los cristales.

Cómo es bien sabido en un cristal ideal existe un orden de largo alcance bien definido, de tal manera que la posición de un

motivo de la red determina unívocamente la del resto de los motivos reticulares. Quiere esto decir que si \vec{a}_1 , \vec{a}_2 , y \vec{a}_3 son los vectores unitarios que definen los parámetros de la celdilla unidad de un cristal, cualquier vector $R=p\vec{a}_1+q\vec{a}_2+r\vec{a}_3$ (dónde p, q y r son números enteros cualesquiera) también definirá la posición de un punto de la red de dicho cristal.

En el líquido amorfo, por el contrario, en base a la teoría desarrollada por Debye (7), Ornstein y Zernike (8) los conceptos de red tridimensional y orden de largo alcance carecen de sentido. Cada unidad estructural del líquido posee el mismo orden de corto alcance con relación a sus vecinos. En otras palabras, la probabilidad de encontrar un cierto número de átomos o moléculas a una distancia R de cualquier átomo o molécula arbitrariamente elegido, es la misma para todos los átomos o moléculas.

En el caso del paracrystal se mantiene el concepto de red pero no el de orden de largo alcance. Las dimensiones de la celdilla unidad varían estadísticamente de una celdilla a otra cómo puede observarse en las figuras 6, 7 y 8 para el caso de redes monodimensionales, bidimensionales y tridimensionales respectivamente.

Si representamos $\Delta_{hkl} = \left(\overline{d_{hkl}^2} - \bar{d}_{hkl}^2 \right)^{\frac{1}{2}}$ cómo la fluctuación que define la separación paracrystalina de una familia de planos caracterizada por una distancia promedio, \bar{d}_{hkl} , la fluctuación entre el primer plano y el plano n+1 viene definida por:

$$(\Delta_{hkl})_n = \Delta_{hkl} (n)^{\frac{1}{2}} \quad |28|$$

Las fluctuaciones estadísticas entre planos reticulares aumentan con la raíz cuadrada del número de planos, perdiéndose el

2A

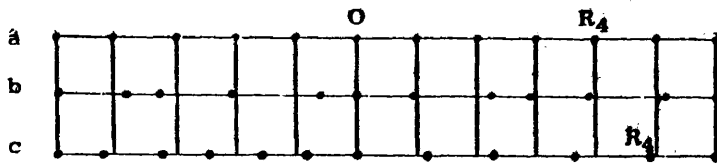


Fig. 6 (a) Red monodimensional ideal (b) Red monodimensional con perturbaciones de primera especie. La amplitud de las fluctuaciones es independiente de la posición (c) Red monodimensional con perturbaciones de segunda especie. La amplitud de las fluctuaciones aumenta con la distancia

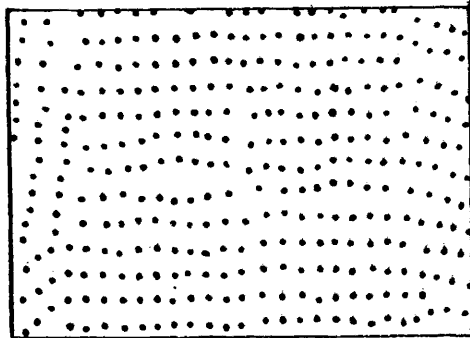


Fig. 7 Red bidimensional paracristalina

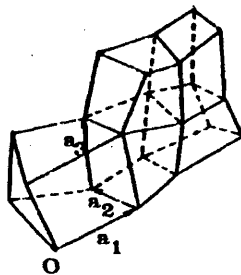


Fig. 8 Red tridimensional paracristalina

orden de largo alcance. Estas distorsiones de la red cristalina provocan un ensanchamiento de las reflexiones en los diagramas de difracción, efecto que se suma a la amplitud debida al propio tamaño de los cristales.

La tabla I ofrece un esquema intuitivo en el que comparan los rasgos más representativos de la teoría de la paracristalinidad frente a las otras teorías convencionales (9).

TABLA I

Comparación del concepto de paracristal frente al de cristal perfecto, líquido y gas.

| | cristal | paracristal | líquido | gas |
|-----------------------------|---------|-------------|---------|-----|
| Red tridimensional | + | + | - | - |
| Orden de largo alcance | + | - | - | - |
| Misma probabilidad a priori | - | + | + | - |

No deben confundirse distorsiones paracristalinas o de segunda especie con distorsiones de primera especie; éstas se presentan cuando los motivos de la red se desvían de sus posiciones ideales en el cristal, como es el caso de las vibraciones térmicas. En una red con defectos de este tipo cualquier punto n se puede localizar mediante el vector

$$\vec{x} = n \vec{a}_i + \delta \vec{x} \quad |29|$$

La posición de los motivos viene determinada mediante una función de probabilidad $H(\vec{x})$ que es la misma para todos los pun

tos de la red, igual para los vecinos primeros que para los n -ésimos. En la Fig.6 se indica la posición instantánea de los puntos de la red con vibraciones térmicas, $\delta \vec{x}_1 \approx 0.3 \text{ \AA}$ en relación a sus posiciones de equilibrio. El orden de largo alcance prevalece en presencia de distorsiones de primera especie. La ecuación |29| indica que la desviación cuadrática media es constante para todos los valores de n . Un diagrama de difracción de una red con distorsiones de primera especie presenta una pérdida de intensidad de las reflexiones cristalinas y un aumento del halo difuso, que se concentra alrededor de dichas reflexiones, pero que no contribuye sin embargo al ensanchamiento de la anchura integral de las mismas.

En el caso de distorsiones paracristalinas las desviaciones de cada motivo molecular de su posición ideal depende solamente de la posición de los motivos vecinos y no de un desplazamiento de los puntos de la red ideal. En un paracristal (10), los vectores de arista \vec{a}_k se representan con el valor \vec{x} a la frecuencia $H_k(\vec{x})$. Designando las celdillas en el paracristal por medio de tres enteros (p, q, r) como en un cristal, $H_{100}(\vec{y})$ en la dirección 100 da la frecuencia previsible del vector separación, \vec{y} , entre los centros de las celdillas vecinas (p, q, r) y $(p+1, q, r)$. Ahora entre los centros de las celdillas $(p+1, q, r)$ y $(p+2, q, r)$ hay un vector de separación distinto, \vec{z} , que de acuerdo con la teoría clásica de líquidos de Debye presenta la misma frecuencia previsible, esto es $H_{100}(\vec{z})$. Ya que no hay correlación entre \vec{y} y \vec{z} , la probabilidad de encontrar esta combinación, está dada por el producto $H_{100}(\vec{y})$ y $H_{100}(\vec{z})$. Si se considera ahora el vector separación $\vec{x} = \vec{y} + \vec{z}$ entre celdillas (p, q, r) y $(p+2, q, r)$ al hallar la estadística de espaciado $H_{200}(x)$ entre estos dos vecinos segundos en proximidad, la posición concreta de la

celdilla intermedia carece de importancia supuesto que el vector su ma $\vec{y}+\vec{z}$ tenga el valor fijado \vec{x} . Esto se traduce matemáticamente si el producto $H_{100}(\vec{y}) H_{100}(\vec{z})$ reemplazamos \vec{z} por $\vec{x}-\vec{y}$, entonces se deben de sumar las frecuencias de todos los productos $H_{100}(\vec{y}) H_{100}(\vec{x}-\vec{y})$ manteniendo \vec{x} constante para obtener la estadística buscada de espaciado $H_{200}(\vec{x})$ entre los vecinos segundos en proximidad, es decir calcular la integral

$$H_{200}(\vec{x}) = \int H_{100}(\vec{y}) H_{100}(\vec{x}-\vec{y}) dy = H_{100}(\vec{x}) * H_{100}(\vec{x}) \quad |30|$$

que no es más que la integral de convolución de la función H_{100} con H_{100} .

La estadística completa de espaciado entre todos los centros de las celdillas que define el sistema, se expresa en el paracrystal mediante un polinomio de convolución que puede calcularse a partir de la estadística de los vecinos más próximos (11) y viene dada por:

$$H(\vec{x}) = \sum_{p,q,r=-\infty}^{+\infty} H_{pqr}(\vec{x}) \quad |31|$$

siendo

$$H_{pqr}(\vec{x}) = P(\vec{x}) \overset{p \text{ veces}}{H_1 * H_1 * \dots * H_1} * \overset{q \text{ veces}}{H_2 * H_2 * \dots * H_2} * \overset{r \text{ veces}}{H_3 * H_3 * \dots * H_3}$$

con $H_1=H_{100}(\vec{x})$, $H_2=H_{010}(\vec{x})$, $H_3=H_{001}(\vec{x})$ y $P(\vec{x})$ la función puntual δ de Dirac.

Los problemas de cálculo que expresiones de este tipo presentan se resuelven con relativa facilidad con ayuda de computadores y teniendo en cuenta la ley matemática de que la transformada de

Fourier de un producto de convolución de dos funciones es el producto de las transformadas de Fourier de ambas.

Según la teoría del paracrystal el ensanchamiento de las reflexiones $(\delta\beta_{hkl})_{pc}$ debido a la fluctuación entre planos vecinos hkl viene dado por

$$(\delta\beta_{hk})_{pc} = \frac{(\pi g_{hk} m)^2}{\bar{d}_{hkl}} \quad |32|$$

siendo

$$g_{hkl} = \frac{(\Delta^2_{hkl})^{\frac{1}{2}}}{\bar{d}_{hkl}} \quad |33|$$

$g_{hkl}=0$ estructura cristalina, $g_{hkl}>0.1$ estructura amorfa

y m el orden de la reflexión hkl ($m=1,2,3\dots$ para los planos 110, 220, 330, respectivamente). Así pues de la pendiente de la variación de $\delta\beta_{hkl}$ en función de m se puede deducir la contribución del tamaño de cristal y la del tipo de distorsión. En el caso de distorsiones paracrystalinas, por extrapolación de $\delta\beta_{hkl}$ para $m=0$ se puede separar la contribución de las distorsiones paracrystalinas de la contribución del tamaño de cristal utilizando la ecuación:

$$\delta\beta_{hkl} = \frac{1}{D_{hkl}} + \frac{(\pi g m)^2}{\bar{d}_{hkl}} \quad |34|$$

donde $\delta\beta_{hkl}$ es la anchura de la reflexión y D_{hkl} el tamaño de cristal en la dirección hkl . Esta separación puede hacerse siempre que se conozca la aditividad de estas contribuciones a la anchura integral.

Una propiedad de los paracrystales reales es que sólo pueden alcanzar un número máximo, N_{hkl} de planos cristalinos. Como resultado empírico de numerosas medidas experimentales se ha llegado a la conclusión de que este valor viene definido por (12-14)

$$N_{hkl} = \left(\frac{\alpha^*}{g_{hkl}} \right)^2 \quad |35|$$

donde α^* es un número sin dimensiones que varía entre 0.1 y 0.2, dependiendo del tipo de interacción intermolecular.

1.2.2. Modelo Paracrystalino de Empaquetamiento de Membranas

La asunción de que los paquetes de membranas pueden considerarse cristales monodimensionales, hecha en la sección 1.1. resulta un caso ideal. En los sistemas reales ocurren distorsiones de empaquetamiento que pueden tratarse como distorsiones paracrystalinas. La idoneidad de este tratamiento lo prueba el hecho de su utilización en el estudio de las membranas de mielina del nervio (15,16,25), eritrocito humano (17) mitocondria (18), tilacoides de Rhodospseudomonas esféricas (19), fotosintéticas (20,21), retículo sarcoplasmático (22), bastones visuales del ojo de rana (23), etc.

Debido a que la periodicidad está definida en la dirección de apilamiento, las distorsiones se considera que ocurren en una red monodimensional, lo que además simplifica en gran manera los cálculos.

La función de probabilidad para los vecinos más próximos, $H(x)$, consideramos que es una distribución de tipo gaussiano

$$H(x) = \left(\frac{c}{\pi} \right)^{\frac{1}{2}} \exp. [-c (x-\bar{L})^2] \quad |36|$$

con

$$\int_{-\infty}^{+\infty} H(x) dx = 1 \quad c = \frac{1}{2\Delta^2} \quad \Delta^2 = (x-\bar{L})^2$$

siendo $\bar{L} = \int_{-\infty}^{+\infty} x H(x) dx$

Para los vecinos n-ésimos la fluctuación vendrá dada por:

$$H_n(x) = H(x) * H(x) * \dots * H(x) \quad |37|$$

(n-1) veces

si H(x) es definida como gaussiana entonces obtenemos:

$$H_n(x) = \left(\frac{c}{\pi}\right)^{\frac{1}{2}} \frac{1}{(n)^{\frac{1}{2}}} \exp(-c/n \cdot (x-n\bar{L})^2) \quad |38|$$

y la función Q vendrá dada por:

$$Q(x) = Q_0(x) * Z^I(x) \quad |39|$$

siendo

$$Z^I(x) = N \delta(x-0) + \sum_{n=1}^{N-1} (N-n) H_n(x \pm n\bar{L}) \quad |40|$$

para un empaquetamiento de N-membranas. La figura 9 muestra la función $Z^I(x)$ para el caso N=3 siendo por lo tanto

$$Z^I(x) = 3\delta(x-0) + 2 H(x+\bar{L}) + 2 H(x-\bar{L}) + H * \\ * H(x+2\bar{L}) + H * H(x-2\bar{L})$$

La función $Q_0(x)$ en función de los parámetros del modelo tal como se expuso en la sección 1.1.4 (ecuaciones |23| y |27|) vendrá dada por

$$Q_0(x) = 2 Q_m + Q_{m_2} * H(x-\bar{L}) \quad \text{para } x \geq 0 \quad |41|$$

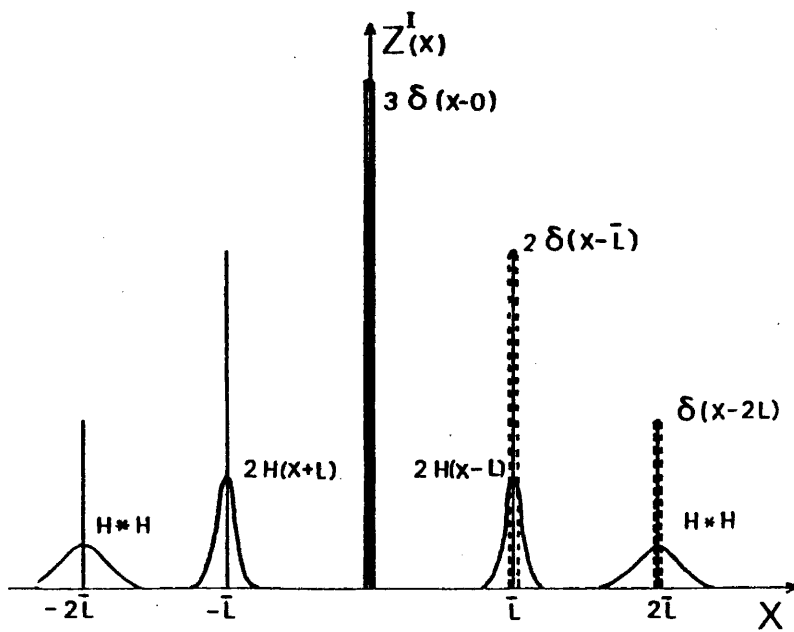


Fig. 9

Si consideramos que el espesor del motivo puede fluctuar, debido a ondulaciones en la superficie de la membrana es necesario introducir entonces dos estadísticas $H_1(x)$ y $H_2(x)$ que dan cuenta de las fluctuaciones dentro de la membrana y entre membranas respectivamente.

La función Q del sistema se expresa entonces [24] cómo:

$$Q(x) = 2 N Q_m^* \delta(x-0) + N Q_{m_1}^* H_2 + (N-1) Q_{m_2}^* H_1 +$$

$$+ 2 (N-1) Q_m^* H_1^* H_2 + (N-1) Q_{m_1}^* H_1^* H_2^* H_1 +$$

$$+ \sum_{n=2}^{N-1} (N-n) [Q_{m_1}^* H_1^* H_2^* H_1 + Q_{m_2}^* H_2 + 2 Q_m^* H_1^* H_2] * [H_1^* H_2]_{n-1} \text{ veces} \quad |42|$$

siendo

$$H_{1,2}(x) = \left[\frac{c_{1,2}}{\pi} \right]^{\frac{1}{2}} \exp[-c_{1,2}(x-\ell_{1,2})^2]$$

$$\ell_{1,2} = \int_{-\infty}^{+\infty} x H_{1,2}(x) dx \quad \ell_1 + \ell_2 = L$$

y la fluctuación $g_{1,2} = \frac{\Delta_{1,2}}{\ell_{1,2}}$

Normalmente basta con usar los cuatro primeros términos de la ecuación [42] para calcular el perfil de densidad electrónica, ajustando la función $Q(x)$ en el intervalo $[0, L]$. Aproximando $N-1 \approx N$ y normalizando la función $Q(x)$ al divisor por N se obtiene para Q_{mod} entre 0 y L la relación:

$$Q_{\text{mod}}(x) = 2 Q_m^* \delta(x-0) + Q_{m_1}^* H_2 + Q_{m_2}^* H_1 + 2 Q_m^* H_1^* H_2 \quad |43|$$

Los términos de Q_{mod} en función de los parámetros del modelo (sección 1.1.4) A_i , c , x_i , $\ell_{1,2}$ y $c_{1,2}$ se expresan ahora:

$$Q_m = \left(\frac{\pi}{2c}\right)^{\frac{1}{2}} \sum_{i=1}^{N_0} \sum_{j=1}^{N_0} A_i A_j \exp\{-0.5 c [x - (x_i - x_j)]^2\}$$

$$Q_{m_1}^* H_2 = \left(\frac{\pi}{2c}\right)^{\frac{1}{2}} \left(\frac{c_2}{c_2 + 0.5c}\right)^{\frac{1}{2}} \sum_{i=1}^{N_0} \sum_{j=1}^{N_0} A_i A_j$$

$$\exp\left\{-\left[\frac{c c_2}{c + 2c_2}\right] [x - (x_i + x_j) - \ell_2]^2\right\} \quad |44|$$

$$Q_{m_2}^* H_1 = \left(\frac{\pi}{2c}\right)^{\frac{1}{2}} \left(\frac{c_1}{c_1 + 0.5c}\right)^{\frac{1}{2}} \sum_{i=1}^{N_0} \sum_{j=1}^{N_0} A_i A_j$$

$$\exp\left\{-\left[\frac{c c_1}{c + 2c_1}\right] [x + (x_i + x_j) - \ell_1]^2\right\}$$

$$Q_m^* H_1^* H_2 = \left[\frac{c_1 c_2 \pi}{c^2 (c_1 + c_2) + c_1 c_2 c}\right]^{\frac{1}{2}} \sum_{i=1}^{N_0} \sum_{j=1}^{N_0} A_i A_j$$

$$\exp\left\{-\frac{c c_1 c_2}{c(c_1 + c_2) + 2c_1 c_2} [x - (x_i - x_k + \ell_1 + \ell_2)]^2\right\}$$

El tiempo de computación de $Q(x)$ depende de los parámetros de entrada y varía entre 2 y 10 minutos.

1.3. Empaquetamiento de fibrillas

La intensidad difractada por N moléculas o cadenas moleculares desorientadas, de acuerdo con Vainstein (3) viene dada, en coordenadas cilíndricas, por la expresión:

$$I(b) = N \left(\overline{|F(b)|^2} - \overline{|F(b)|^2} + \overline{|F(b)|^2} G_N(b) \right) \quad |45|$$

donde N es el número de moléculas, b el vector en el espacio recíproco, $G_N(b) = \sum_{P,P'} J_0(2\pi r_{PP'} b)$ tiene en cuenta la distribución espacial de las moléculas, siendo $r_{PP'}$ la distancia entre centros de moléculas, $\overline{|F(b)|^2} = \overline{F_j(b) F_k(b)}$ para $j \neq k$ es el promedio sobre las distintas orientaciones siendo F_j el factor de estructura para una molécula $\overline{|F(b)|^2} = \overline{F_j F_j}$ es el promedio sobre la misma molécula para $j=k$.

La fórmula |45| se simplifica en el caso de moléculas iguales y paralelas pues entonces $\overline{|F|^2} = |\overline{F}|^2$. Para el caso de fibrillas y segmentos de α -hélice se puede considerar que el factor de estructura es el mismo que el de una varilla cilíndrica (3) teniendo entonces:

$$|\overline{F}|^2 = F_c^2 = \left[r_0 \frac{J_1(2\pi r_0 b)}{b} \right]^2 \quad |46|$$

siendo J_1 la función de Bessel de orden 1 y r_0 el radio de la varilla. En la Fig. 10 puede verse la variación de F_c^2 frente a b para los distintos valores del radio.

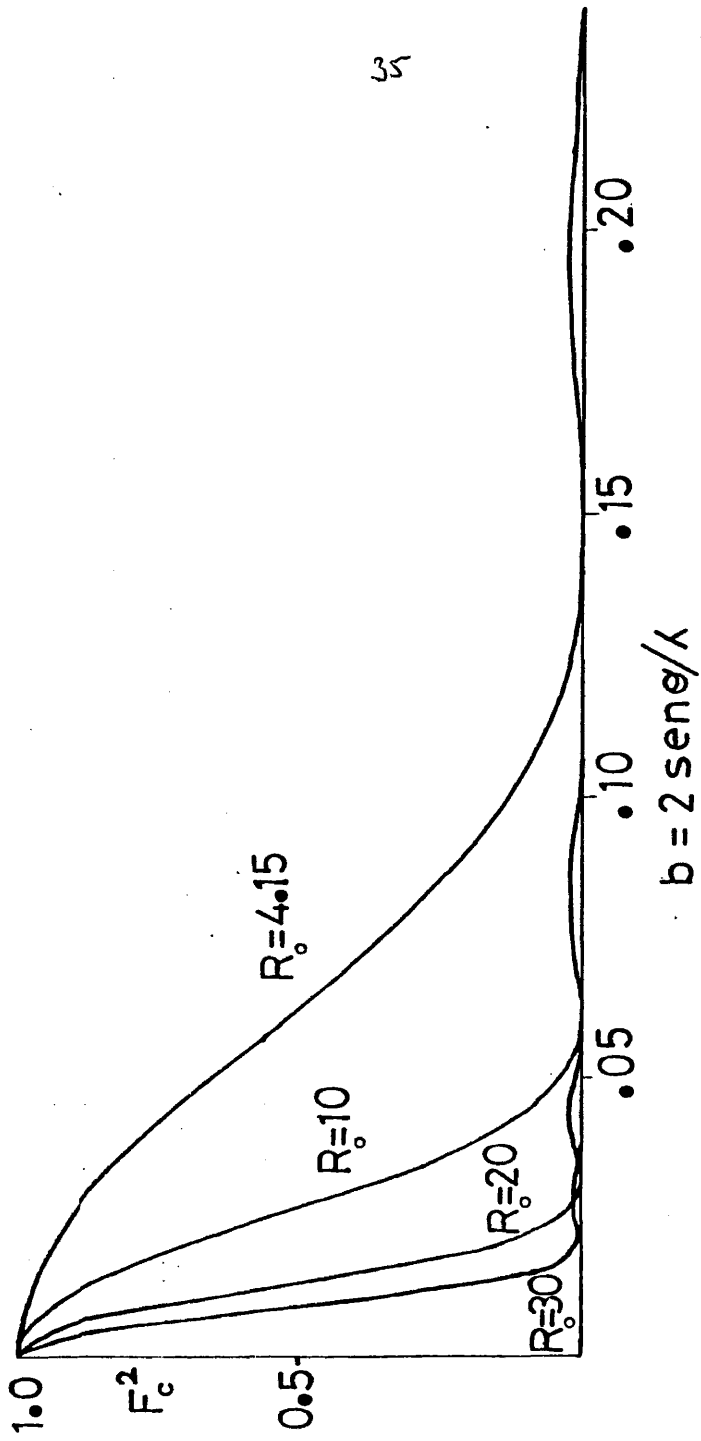


Fig. 10

La función $G_N(b)$ depende del número de moléculas consideradas y de la forma en que se ordenen. La expresión analítica de $G_N(b)$ para el caso de $N=4$ y 7 en disposición hexagonal viene dada por:

$$G_4(u) = [4 + 10 J_0(u) + 2 J_0(u\sqrt{3})]$$

$$G_7(u) = [7 + 24 J_0(u) + 12 J_0(u\sqrt{3}) + 6 J_0(2u)]$$

siendo $u=2\pi r_{pp}/b$. La representación $G_N(u)$ frente a u para $N=4$ y 7 se muestra en la Fig. 11. La función de interferencia G_N puede calcularse de igual manera para cualquier número de moléculas N con una distribución espacial dada.

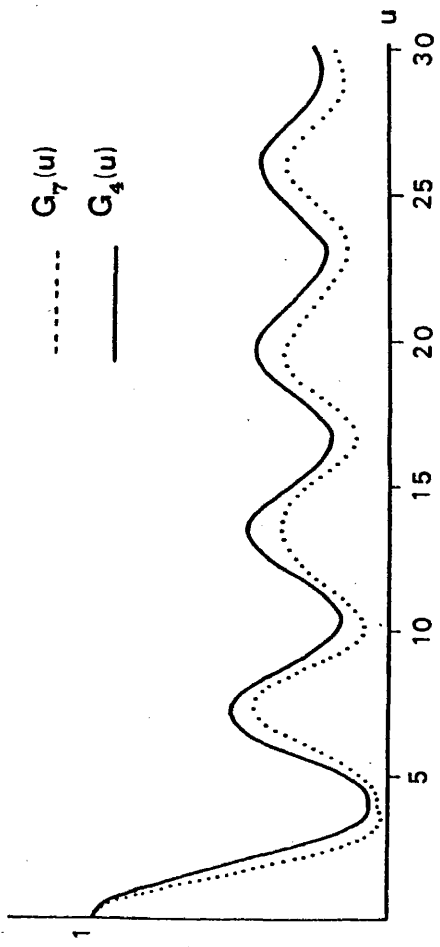


Fig. 11

1.4. MEMBRANA PURPURA DE HALOBACTERIUM HALOBIIUM:
ESTRUCTURA Y FUNCION.

1.4.1. Antecedentes

La conversión de la energía radiada por el sol en energía química y su utilización en los procesos metabólicos se lleva a cabo en las plantas, algas y bacterias que incluyen en su estructura clorofila. La absorción de la luz por la clorofila inicia una cadena de reacciones cuyo resultado es la formación de moléculas con enlaces de elevada energía, esto es moléculas de ATP.

A finales de la década de los sesenta, despertó gran interés el descubrimiento, en una familia de bacterias, de un mecanismo de conversión de energía luminosa en energía química, que no utilizaba la clorofila, sino un pigmento relacionado estructuralmente con el pigmento visual de los ojos de los animales (26,27). Estas bacterias se caracterizan por necesitar altas concentraciones de cloruro sódico para su supervivencia y crecimiento, encontrándose - las por tanto en salinas y lagos salados.

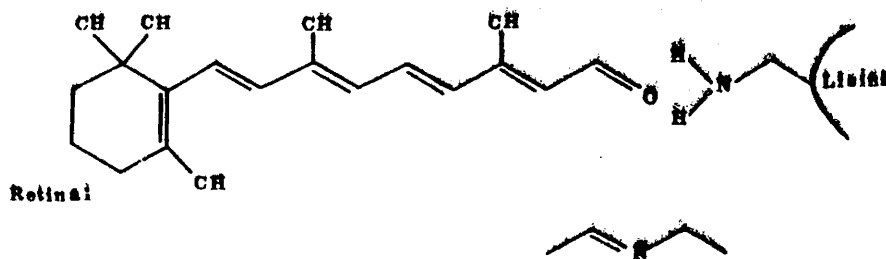
La especie Halobacterium Halobium, la más estudiada, crece en concentraciones de ClNa 4.3 M, lo que significa 250 gr de sal por litro de disolución. Al diluir el medio, la bacteria empieza perdiendo su forma abastionada, después el contenido celular sale al exterior y a concentraciones de 0.1 M, la membrana celular se fragmenta (27) en laminillas que mediante centrifugación en gradientes de densidad se separan en dos fracciones; una de baja densidad llamada fracción de membranas rojas y otra de mayor densidad llamada fracción de membranas púrpura, denominadas así debido a su coloración (29).

Relacionando microfotografías de membrana celular completa con microfotografías de MP, se dedujo que el material de la fracción de MP no estaba difuso sobre la membrana sino que formaba una serie de áreas discretas, incluidas sin solución de continuidad en la membrana celular (28,30).

La MP vista al microscopio consta de laminillas bastante uniformes de tamaño, que presentan en su superficie fracturas, formando entre sí ángulos de 60 y 120°. Su composición es fundamentalmente proteica, 75% en peso frente al 25% restante de lípidos. Contiene una única especie proteica de peso molecular 26.000 con un elevado contenido de aminoácidos hidrofóbicos, aproximadamente el 62%, lo que sugiere que gran parte de la molécula de proteína tiene que estar embebida en el interior hidrofóbico de la membrana (28,30,31).

El espectro de absorción de MP muestra una banda entre 560 y 570 nm en el amarillo-verde del visible y un fuerte pico de 280 nm en el ultravioleta, característico de las proteínas. Buscando el pigmento responsable del color púrpura se encontró que la proteína de MP contiene un grupo retinal por molécula (28,32). El retinal asociado a las diferentes proteínas opsinas es el cromóforo de todos los pigmentos visuales en los animales, apareciendo también en el complejo rodopsina, el pigmento de las células abastionadas del ojo humano. La unión retinal-proteína en los pigmentos visuales se realiza a través de lo que se llama una base de Schiff, enlace entre el grupo aldehído -CHO- del retinal y un grupo amino, -NH₂, de ciertos aminoácidos de la proteína. En la rodopsina, el pigmento visual humano, esta unión se realiza a través del grupo amino de una lisina, ver fig. 12. La unión del cromóforo a la proteína de MP se lleva a cabo de idéntica manera, por lo que se la llamó Bateriaiorhodopsina.

La base de Schiff entre el retinal y la lisina de la bacteriorhodopsina ha de encontrarse embebida dentro de un entorno de aminoácidos hidrofóbicos, para evitar su hidrólisis en un medio acuoso (32).



La difracción de Rayos-X indicó que las moléculas de proteína se disponen regularmente en el plano de la membrana (30), en una ordenación que se aproxima a la de un cristal bidimensional de celdilla unidad hexagonal. Las moléculas de BR atraviesan la membrana y se orientan todas en la misma dirección, dispuestas en grupos de tres alrededor de un eje ternario, perpendicular al plano de la membrana, en el centro del grupo (33,34). Los lípidos están dispuestos en dos capas, como en una bicapa, pero probablemente con una distribución cuantitativa asimétrica (35) y posiblemente localizados en regiones discretas entre los grupos de proteína. Combinando microscopía electrónica y difracción de electrones (36), se vió que cada proteína contiene siete segmentos de α -hélice perpendiculares al plano de la membrana. El agrupamiento de las tres proteínas alrededor de un eje ternario se realiza de modo que tres α -hélices de las siete de cada proteína se disponen formando una corona central de nueve hélices, mientras que las cuatro restantes por proteína forman una corona de 12 α -hélices externa a la anterior (37,38).

La similitud entre BR y los pigmentos visuales sugirió - inmediatamente que su función en la célula podía estar relacionada con la absorción de luz. La gran cantidad de MP en la membrana celular hizo pensar que además de una función sensora (las células al disminuir la intensidad luminosa en su camino se paran e invierten el movimiento) (30,40), debía estar asociada con alguna función metabólica (41). De ser esto así, a través de medidas del contenido de ATP en las células podría detectarse el papel que la MP tiene en el metabolismo energético de las mismas.

Paralelamente se encontró que al iluminar la membrana se produce un movimiento de protones (41) desde el interior al exterior celular, reflejado en un cambio de pH en el medio (42,44). Se descubrió entonces una reacción fotosintética cíclica que incluye varios intermediarios. La absorción de luz pone en marcha un ciclo que se completa en pocos milisegundos y va acompañado del transporte de protones del interior al exterior celular (44,46).

La relación entre la síntesis de ATP y el gradiente generado por la luz puede verse suspendiendo bacterias en una solución salina, sin nutrientes, en la oscuridad y bombeando nitrógeno a través del medio. En estas condiciones la concentración de ATP en las células cae rápidamente al 30% de su nivel original y permanece constante en este valor (43,47). Aparentemente las células pueden cancelar la mayoría de los procesos que requieren energía cuando las fuentes externas de energía no están disponibles. Al iluminar las células, el contenido de ATP en las mismas sube rápidamente hasta el nivel original. Bombeando aire, lo cual significa introducir oxígeno en la suspensión, se observa el mismo efecto que iluminando, el contenido de ATP sube. Al hacer el experimento con radiaciones

de diferentes longitudes de onda se observa que sólo a longitudes de onda iguales a la absorbida por MP es efectiva en la síntesis de ATP (48, 49). Ambas, respiración e iluminación generan un gradiente de protones a través de la membrana celular, utilizado por ésta en la síntesis de ATP.

El problema de asignar este comportamiento de forma exclusiva a la MP se resolvió vaciando las células a concentraciones salinas del medio, 2 M. En estas condiciones la mayor parte del contenido citoplasmático sale al exterior y sólo quedan las membranas celulares. Asegurando que la orientación de MP es estas envolturas celulares se mantuviese, se encontró una respuesta idéntica a la iluminación que la obtenida con la célula completa, esto es, al iluminarla se genera un gradiente electroquímico a través de la membrana (49,53).

La posibilidad de que la membrana Roja, el otro componente de la membrana celular, jugase algún papel se excluyó cuando se consiguió incorporar MP a vesículas de lípidos (50). Al exponer estas preparaciones a la luz, la membrana reconstituida actuó como una eficaz bomba de protones. Vesículas con distintas clases de lípidos fueron usadas como matriz y en todos los casos al incorporar MP actuaban bombeando protones. A partir de entonces ya no se albergó ninguna duda de que la BR era agente responsable de tal comportamiento (48,50,54,60).

El bombeo de protones llevado a cabo por la BR es la MP tiene lugar en un solo sentido pero no en el contrario; se establece así un gradiente de concentración de protones que genera una diferencia de potencial entre el interior y el exterior celular de 180 a 280 mV (61,64). La energía almacenada en este gradiente la

utiliza la célula en la síntesis de ATP a partir del ADP. La función primordial de la MP es hacer de la luz una fuente de energía alternativa a la respiración.

El conocimiento del mecanismo intramolecular de bombeo de protones comienza con la localización del retinal en MP, y la determinación de su orientación en la misma usando técnicas de difracción de neutrones a bajo ángulo en dispersiones acuosas de membranas. El método consiste en observar las diferencias entre el diagrama de difracción de MP con retinal normal y MP con retinal deuterado. Se llega a la conclusión de que el anillo β -inona del retinal está situado en el centro de la membrana (65) aunque esta posición es discutida por algunos autores (66).

Otro resultado interesante obtenido con difracción de neutrones es la conclusión de que no existen huecos en la molécula de BR en los cuales quepan más de 12 moléculas de agua, lo cual parece que excluye la posibilidad de transporte pasivo a través de un canal acuoso en la proteína (67), aunque no definitivamente puesto que esta técnica es insensible para la detección de poros formados con nueve moléculas de agua o menos. Nueve moléculas de agua podrían formar un canal de una molécula de diámetro que atravesaría el 80% del espesor de la membrana.

La composición de aminoácidos de la proteína fué determinada por diversos autores (28,68,70), aunque existen algunas discrepancias cómo puede observarse en la tabla II. Durante el último año se han publicado los primeros intentos de ajustar la secuencia de aminoácidos (66,71,73) en los siete fragmentos de α -hélice y establecer las posiciones relativas de estas hélices entre sí. Sóloamen-

TABLA II

Composición de aminoácidos de la BR según distintos autores

| | Número de residuos | | | |
|--------------|--------------------|---------------------|------------------|--------------------------|
| | Keefer y Bradshaw | Stoeckenius y Kunau | Bridgen y Walker | Oesterhelt y Stoeckenius |
| Lisina | 6 | 12 | 7 | 8 |
| Histidina | 0 | 1 | 2 | 1 |
| Arginina | 7 | 14 | 7 | 9 |
| Triptófano | 4 | — | 4 | 4 |
| Aspartato | 13 | 14 | 15 | 16 |
| Treonina | 19 | 17 | 18 | 18 |
| Serina | 14 | 12 | 13 | 14 |
| Glutamato | 14 | — | 16 | 17 |
| Prolina | 10 | 16 | 11 | 11 |
| Alanina | 30 | 29 | 28 | 28 |
| Valina | 21 | 18 | 20 | 19 |
| Metionina | 8 | 10 | 8 | 8 |
| Isoleucina | 13 | 14 | 14 | 12 |
| Leucina | 33 | 32 | 30 | 30 |
| Tirosina | 10 | 9 | 11 | 10 |
| Fenilalanina | 12 | 11 | 13 | 13 |

44

te la ordenación de las siete α -hélices entre sí presenta 5040 posibilidades, esto es $7!$ lo que justifica 10080 formas de orientación, algunas de ellas pueden descartarse en base a criterios tales como separación entre cargas a lo largo del eje de la hélice, neutralización de cargas, longitud de los segmentos. etc. aún así el número de posibles soluciones es muy grande. La solución a este problema de conocer la estructura a nivel atómico y ordenación de los aminoácidos sería posible si se consiguieran cristales tridimensionales de proteína, tema objeto de investigación en diversos laboratorios en distintos países en este momento.

En el último año se consiguieron cristales bidimensionales de MP donde la celdilla unidad en vez de hexagonal es ortorrómbica (74). Las moléculas de proteína no aparecen agrupadas formando trímeros sino monómeros. La estructura del monómero confirmó las predicciones de que la BR estaba formada por siete α -hélices fuertemente conectadas entre sí

En la obtención de cristales tridimensionales supone un avance importante el haber conseguido cristales tridimensionales de MP (75) y BR (76), aunque su tamaño todavía no es lo suficientemente grande como para poder permitir el análisis con técnicas de difracción de Rayos-X y de electrones. No obstante muestra un camino por el que se ha de seguir en los próximos años hasta conseguir el primer cristal de proteína de membrana.

1.4.2. Objetivos de este trabajo

No es sorprendente que durante los últimos años haya habido un renovado interés en el campo de la investigación biofísica que trata del estudio de sistemas biológicos, mediante técnicas de difracción, ya que la comprensión de las funciones biológicas de membranas, proteínas, enzimas, etc. depende en gran medida del conocimiento que se tenga de su estructura y organización. La difracción de Rayos-X proporciona una valiosa información estructural, puesto que permite su estudio en condiciones similares a las que se dan en la célula viva, llegándose en alguna ocasión a poder estudiar membranas de animales superiores vivos como es el caso de la membrana de los segmentos exteriores de los bastones visuales en el ojo de la rana (77).

La comprensión de la organización molecular de las membranas biológicas requiere información específica de la localización y distribución topológica de los componentes de la membrana. La mayor parte de la metodología usada para elucidar la organización de la membrana nos proporciona información de la estructura transversal de la misma, es decir, en que lado de la membrana está localizado cada uno de los componentes de la misma (lípidos y proteínas). Esto es debido en parte a la distribución desordenada de las proteínas y en base a esto se sugirió (78) que la matriz lipídica debía tener una naturaleza fluida en su estado natural.

La MP, objeto de este trabajo, presenta una excepción dentro del anterior esquema; la única proteína de membrana, la BR no está distribuida al azar en su superficie, sino ordenada formando una red bidimensional, con consecuencias funcionales todavía sin explicar.

Resumidas brevemente las razones que han despertado el interés por la MP son las siguientes:

1) El descubrimiento por Oesterhelt y Stoeckenius de un sistema fotosintético nuevo en esta membrana, distinto del conocido hasta ahora en la clorofila. Según estos autores la MP actúa como membrana fotosintética y fotosensora.

2) Se ha encontrado una única proteína de membrana, la bacteriorhodopsina, que presenta una distribución ordenada en el plano de la membrana, lo cual permite usar métodos de difracción en su estudio.

3) Funcionalmente el sistema BR es muy sencillo si se compara con el sistema fotosintético de la clorofila o el sistema fotorreceptor de la rodopsina visual. Por lo tanto se espera obtener una valiosa información que ayude a un mejor conocimiento de otras proteínas de membrana así como de los mecanismos de fotorrecepción y fototransducción de energía luminosa en energía química.

4) Debido a que la membrana se extrae del H.H. que es una halófila que vive en medios de concentración de ClNa muy altos, 4,3 M, no presenta problemas de contaminación ni de esterilización.

5) Se trata de una fuente biológica barata y abundante que exige unas técnicas de preparación mínimas.

En nuestro caso el interés se debe también al hecho de que la MP sea objeto de un proyecto de investigación en el que participan distintos grupos de los Institutos Rocasolano y Estructura de la Materia, que aboradando un estudio con diferentes técnicas pretenden avanzar en la comprensión de la relación estructura fun -

ción y solucionar los problemas que este sistema plantea.

En el modelo de MP aceptado actualmente hay algunos puntos en lo que se refiere al estudio con técnicas de difracción de Rayos-X que no han sido tratados. Así la información obtenida mediante microscopía electrónica de que la proteína BR consta de siete segmentos de α -hélice densamente empaquetados que se extienden perpendicularmente al plano de la membrana, o el hecho de que las proteínas se agrupan formando trímeros debe verse reflejado en el diagrama de difracción de Rayos-X, debido a la relación que existe entre la intensidad difractada con forma y tamaño del motivo difractante. Por otro lado este modelo no explica detalles que aparecen en los diagramas tales como el ensanchamiento de las reflexiones al aumentar el orden o el halo difuso a 10 \AA presente en la dirección ecuatorial. Ello nos ha llevado a pensar en la necesidad de investigar la estructura supramolecular de la MP teniendo en cuenta el concepto de corto alcance, es decir hasta que punto la MP se comporta como una estructura paracrystalina. Se trata de aplicar la teoría de Hosemann (79) al análisis de las reflexiones meridionales y ecuatoriales con el fin de obtener el grado de fluctuación relativa de los largos espaciados reticulares en las direcciones perpendicular y en la paralela al plano de la membrana.

La difracción de Rayos-X de membranas orientadas proporciona además información relativa al modo de empaquetamiento de las moléculas de lípidos y proteína en la membrana a una resolución cercana a los 10 \AA si se puede resolver el problema de la fase para reflexiones lamelares (dirección meridional). De los varios métodos para solucionar el problema de las fases y calcular el perfil de densi

dad electrónica (80-83) hemos escogido utilizar el de Pape y Kreutz (84) por ser un método directo que además considera en los cálculos las distorsiones que ocurren en el empaquetamiento de las membranas.

Para tratar de alcanzar estos objetivos se estableció el siguiente plan de trabajo:

1) Estudio de los diagramas de difracción con el haz de Rayos X con el haz incidente perpendicular al plano de la membrana.

A partir de estos registros se calculan los parámetros de celdilla unidad del sistema difractante y se investigan teniendo en cuenta el concepto de corto alcance las distorsiones presentes en el empaquetamiento de la proteína en la superficie de la membrana, obteniéndose el grado de fluctuación en las distintas direcciones.

Los pasos son:

- Desconvolucion del perfil experimental del perfil del haz primario para obtener el perfil verdadero
- Resolución de este último y cálculo de la anchura integral de las reflexiones.
- Cálculo del factor de fluctuación paracrystalina "g" y tamaño de cristal en las distintas direcciones.
- Justificación de la intensidad difractada en esta dirección, posición y amplitud de los máximos de intensidad.

2) Estudio de los diagramas de difracción con el haz de Rayos X incidente paralelo al plano de la membrana.

Una vez conseguidos apilamientos de membranas orientadas a partir de las intensidades registradas en la dirección meridional

(dirección de apilamiento de las membranas) se calcula el perfil de densidad electrónica de MP. Hacemos este cálculo a través de los siguientes pasos:

- Separación del haz primario del perfil experimental de la intensidad difractada.
- Fluctuación paracristalina y tamaño de los paquetes de membranas.
- Cálculo de la función de Patterson generalizada o transformada de Fourier inversa de la intensidad, función Q_{exp} .
- Refinamiento de los parámetros del modelo comparado Q_{exp} y Q_{mod} .
- Obtención del perfil de densidad electrónica.

BIBLIOGRAFIA

1. Kreutz, W., Pape, E.H., Summer Institute on the Physics of Biological membranes (Colbow, K., Ed.), Vancouver B.C., Canada (1978)
2. Marquardt, D.W., J. Soc. Ind. Appl. Math. 11, 431 (1963)
3. Vainshtein, B.K., "Diffraction of X-Rays by Chain Molecules", Elsevier Publishing Co., Amsterdam, London, New York (1966)
4. Pape, E.H., Kreutz, W., J. Appl. Cryst. 11, 421 (1978)
5. Buerger, M.J., "Vector Space. Its Application in Crystal Structure Investigation", John Wiley and Sons Inc., New York (1959)
6. Hosemann, R., Z. Phys. 1, 128 (1950)
7. Debye, ., Phys. Z., 28, 135 (1927)
8. Ornstein, I.S., Zernike, F., Inst. Proc., 17, 743 (1914)
9. Hosemann, R., Lemm, K., Wilke, W., Mol. Cryst., 1, 333 (1967)
10. Hosemann, R., J. Polymer Sci., 20, 1 (1967)
11. Hosemann, R., CRC Critical Review in Macromolecular Science, 194, 351 (1972)
12. Hosemann, R., Makromolekular Chem. Sppl., 1, 559 (1975)
13. Hosemann, R., Baltá Calleja, F.J., Ber. Bunsenges Phys. Chem. 84, 91 (1980)
14. Baltá Calleja, F.J., Hosemann, R., J. Appl. Cryst., 13, 521 (1980)
15. Nelander, J.C., Blaurock, A.E., J. Mol. Biol., 118, 497 (1978)
16. Gbordzoe, M.K., Kreutz, W., J. Appl. Cryst., 11, 489 (1978)
17. Pape, E.H., Klott, K., Kreutz, W., Biophys. J., 19, 141 (1977)
18. Müller-Klieser, ., Kreutz, W., Z. Naturforschung, 31c, 612 (1976)
19. Pape, E.H., Menke, W., Weick, D., Hosemann, R., Biophys. J., 14, 221 (1974)
20. Kreutz, W., Menke, W., Z. Naturforschung, 17b, 675 (1962)
21. Kreutz, W., Z. Naturforschung, 19b, 441 (1964)

22. Herbette, L., Marquardt, J., Scarpa, A., Blasie, J.K.,
Biophys. J., 20, 245 (1977)
23. Funk, J., Welte, W., Hodapp, N., Wutschel, I., Kreutz, W.,
Biochem. Et. Biophys. Acta, 640, 142 (1981)
24. Gbordzoe, M.K., Kreutz, W., *J. Appl. Cryst.*, 11, 489 (1978)
25. Gbordzoe, M.K., Kreutz, W., *Z. Naturforschung*, 33C, 184 (1978)
26. Stoeckenius, W., Rowen, R., *J. Cell. Biol.*, 34, 365 (1967)
27. Stoeckenius, W., Kunau, W.H., *J. Cell. Biol.*, 38, 337 (1968)
28. Oesterhelt, D., Stoeckenius, W., *Nature New Biol.*,
233, 149 (1971)
29. Larsen, H., *Adv. Microbiol. Physiol.*, 1, 97 (1967)
30. Blaurock, A.E., Stoeckenius, W., *Nature New Biol.*,
233, 152 (1971)
31. Stoeckenius, W., *Sci. Am.*, 243(6), 38 (1976)
32. Bridgen, J., Walker, I.D., *Biochem.*, 15, 792 (1976)
33. Henderson, R., *J. Mol. Biol.*, 93, 123 (1975)
34. Blaurock, A.E., *J. Mol. Biol.*, 93, 139 (1975)
35. Blaurock, A.E., King, G.I., *Science*, 196, 1101 (1976)
36. Unwin, P.N.T., Henderson, R., *J. Mol. Biol.*, 94, 245 (1975)
37. Henderson, R., Unwin, P.N.T., *Nature*, 257, 28 (1975)
38. Henderson, R., *Ann. Rev. Biophys. Bioenerg.*, 6, 87 (1977)
39. Dencher, N., Wilms, M., *Biophys. Struct. Mech.*, 1, 259 (1975)
40. Hildebrand, E., Dencher, N., *Nature*, 257, 46 (1975)
41. Oesterhelt, D., Stoeckenius, W., *Proc. Natl. Acad. Sci.*,
70, 2853 (U.S.A)
42. Oesterhelt, D., Hess, B., *Eur. J. Biochem.*, 37, 316 (1973)
43. Danon, A., Stoeckenius, W., *Proc. Natl. Acad. Sci.*,
71, 1234 (1974)
44. Lozier, R.H., Bogomolni, R.A., Stoeckenius, W., *Biophys. J.*
15, 955 (1975)
45. Oesterhelt, D., Stoeckenius, W., *Methods Enzymol.*
31, 667 (1974)

46. Stoeckenius, W., Lozier, R.H., *J. Supramol. Struct.*, 2, 769 (1974)
47. Bielyakova, T.N., Kodzyauskas, Y.P., Skulachev, V.I., Sumirnova, I.A., *Dokl. Akad. Nauk.*, 223, 483 (URSS)
48. Bogomolni, R.A., Baker, R.A., Lozier, R.H., Stoeckenius, W., *Bioche. Biophys. Acta.*, 440, 68 (1976)
49. Hwang, S.B., Stoeckenius, W., *J. Membr. Biol.*, 33, 325 (1977)
50. Racher, E., Hinkle, P.C., *J. Membr. Biol.*, 17, (1974)
51. Kayushin, L.P., Skulachev, V.P., *FEBS Lett.*, 39, 39 (1974)
52. Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H., Kagawa, Y., Takenchi, Y., Onho, K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 67, 1295 (1975)
53. Drachev, L.A. et al., *J. Biol. Chem.*, 251, 7059 (1976)
54. Cherry, R.J., Müller, H., Henderson, R., Heyn, M.P., *J. Mol. Biol.*, 121, 283 (1978)
55. Ormos, P., Danczhazy, A., Karvaly, B., *Biochem. Biophys. Acta.* 503, 304 (1978)
56. Hong, F.T., Montal, M., *Biophys. J.*, 25, 465 (1979)
57. Stoeckenius, W., Lozier, R., Bogomolni, R., *Biochem. Biophys. Acta.*, 505, 215 (1979)
58. Dencher, N.A., Heyn, M.P., *Biophys. J.*, 25, 318 (1979)
59. Dencher, N.A., Heyn, M.P., *FEBS Letters*, 108, 307 (19)
60. Kuo-sen Huang, Hagan, B., Gobinkhorana, ., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77, 323 (U.S.A)
61. Michel, H., Oesterhelt, D., *FEBS Lett.*, 65, 175 (1976)
62. Bogomolni, R.A., *Fed. Proc.*, 36, 1833 (1977)
63. Renthal, R., Lanyi, J.K., *Biochem.*, 15, 2136 (1976)
64. Henderson, R., *Ann. Rev. Biophys. Bioenerg.*, 6, 87 (1977)
65. King, G.I., Stoeckenius, W., Crepí, H.L., Schoenborn, B.P., *J. Mol. Biol.*, 130, 395 (1977)
66. Engelman, D.M., Henderson, R., Mac Lachlan, A.D., Wallace, B.A., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77, 2023 (U.S.A)
67. Zaccai, G., Gilmore, G.J., *J. Mol. Biol.*, 132, 181 (1979)
68. Bridgen, J., Walker, J.D., *Biochem.*, 15, 792 (1976)

69. Keefer, L.M., Brodshaw, R.A., Fed. Proc., 36, 1799 (1977)
70. Kaplan, H., Cheng, D.C.H., Oda, G., Kates, M.,
Can. J. Biochem., 55, 669 (1978)
71. Ovchinnikov, Y., Abdulev, N., Feigira, M., Kiselev, A.,
Lovanov, N., Febs. Lett. 100, 219 (1979)
72. Gerber, G.E., Anderegg, R.J., Herlihy, W.C., Gray, C.P.,
Biemann, K., Khorana, H.G., Proc. Natl. Acad. Sci., 76, 227 (U.S.A)
73. Walker, J.E., Carne, A.F., Schmitt, H., Nature, (London),
278, 653 (1979)
74. Michel, H., Oesterhelt, D., Henderson, R., Proc. Natl. Acad.
Sci., 77, 338 (U.S.A)
75. Henderson, R., Shotton, D., J. Mol. Biol., 139, 99 (1980)
76. Michel, H., Oesterhelt, D., Proc. Natl. Acad. Sci.,
77, 1283 (1980).
77. Funk, J., Welte, W., Hodapp, N., Wutschel, I., Kreutz, W.,
Biochem. Et Biophys. Acta, 640, 142 (1981)
78. Linger, S.J., Nicolson, G.L., Science, 175, 720 (1972)
79. Hosemann, R., Bagchi, S.N., "Direct Analysis of Diffraction
by Matter", North Holland Publishing, Co., Amsterdam (1962)
80. Lesslaner, W., Blaric, J.K., Biophys. J., 12, 2 (1972)
81. Lesslaner, W., Cain, J., Blassie, J.K., Biochem. Biophys. Acta,
241, 2 (1971)
82. McIntosh, T.J., Worthington, C.R., Biophys. J., 14, 363 (1974)
83. Worthington, C.R., Khore, R.S., Biophys. J., 23, 407 (1978)
84. Pape, E.H., Kreutz, W., J. Appl. Cryst., 11, 241 (1978)

55

2. EXPERIMENTAL

•

2.1. CULTIVO DE HALOBACTERIUM HALOBIVM Y PREPARACION DE DE MEMBRANA PURPURA

2.1.1. Cultivo de Halobacterium halobium

La cepa de Halobacterium halobium (HH) empleada en este trabajo fué facilitada por el Dr. Oesterhelt, uno de los primeros investigadores que trabajaron con la Membrana Púrpura (MP) (1). Esta cepa es una mutante de Halobacterium halobium, conocida con el nombre de R₁M₁, que presenta la peculiaridad de estar exenta de vacuolas gaseosas lo cual facilita enormemente la separación de las fracciones de membranas roja (MR) y púrpura (MP).

El procedimiento de cultivo que se siguió fué el mismo que utilizaron Oesterhelt y Stoeckenius (1-3), con ligeras modificaciones (4).

2.1.2. Preparación de Membrana Púrpura

Las células se recogen del medio de cultivo por centrifugación a 13.000xg y a 4°C.

La muestra obtenida se suspende en 100 ml de ClNa 4 M a los que se agregan 5mg de DNasa. A continuación se dializan frente a 5 l de agua destilada. El choque osmótico lisa las células y la DNasa previene la aparición de viscosidades altas como consecuencia de la liberación de ADN.

La preparación así obtenida se centrifuga primero a 10.000xg durante 10 minutos con objeto de eliminar cualquier impureza acumulada y posteriormente a 50.000xg durante 30 min. para sepa-

rar toda la fracción celular soluble y parte de la membrana roja. Los precipitados se suspenden en agua destilada y se someten a fraccionamiento en gradientes de sacarosa.

Para estos gradientes se usaron un rotor angular 50 de 8x25 ml centrifugando a 150.000xg y otro rotor SW25 de 6x36 ml centrifugando a 85.000xg durante intervalos de tiempo comprendidos entre 15 y 20 horas.

La banda de MP aparece en la interfase 1.4 - 1.3 M de gradiente de sacarosa mientras que la membrana roja aparece en la interfase agua - 1.2 M de sacarosa.

Las fracciones de MR y MP se recogen separadamente y se guardan a baja temperatura en suspensión de sacarosa. La eliminación de sacarosa se consigue mediante diálisis o mediante varios lavados sucesivos con agua destilada y centrifugación a 100.000xg durante 1 hora. En una célula de hostafán especialmente diseñada, situada en el fondo de la cubeta de centrifugación se recoge la muestra de MP orientada que usaremos en la cámara de difracción.

2.2. Geometría de la cámara de difracción a bajo ángulo

La diferenciación entre ángulos altos y ángulos bajos al hablar de difracción de Rayos-X se establece dependiendo del ángulo de difracción, definido mediante la ley de Bragg. La división es arbitraria y un espaciado de 30 Å suele tomarse como línea divisoria (5). Las membranas biológicas presentan espaciados que varían entre varias decenas y algunos centenares de Å, es debido a esto por lo que su estudio se efectúa a ángulos bajos.

La técnica de difracción de Rayos-X a ángulos bajos requiere un especial cuidado, ya que al operar por transmisión se debe centrar el sistema de colimación con una gran precisión y buscar la resolución adecuada al efecto de difracción que se desea medir.

Existen diversos métodos que permiten realizar la colimación del haz de Rayos-X, a saber: rendijas (6), colimadores puntuales (7), cámara de Kratky (8), focalización por reflexión (9) y focalización por difracción (10). En el presente trabajo hemos utilizado una cámara de difracción de Rayos-X de ángulos bajos diseñada por H. Kiessig (11) con colimación puntual, modificada por nosotros mediante el diseño y construcción de un colimador puntual de 0.2ϕ mm con el objeto de conseguir mejor resolución. La cámara se acopló a un generador de Rayos-X de 12 kW de potencia de la casa Rigaku-Denki usándose foco normal de tamaño $0.5 \times 1 \text{ mm}^2$ en la superficie del ánodo. La radiación empleada es la K_{α} del Cu filtrada con níquel. La cámara de Kiessig consta de 4 colimadores puntuales, y hemos usado la combinación $0'3/0'5/0'3/0'2/\phi$ mm. La figura 1 representa esquemáticamente el principio básico de la cámara de colimación puntual empleada, donde por simplicidad sólo se representan los colimadores primero y cuarto que definen la divergencia del haz. S, es la placa interceptora del haz, P, la película fotográfica, D, el espesor de la muestra (~ 0.5 a 1 mm), l , la distancia entre los colimadores, A, la distancia muestra-film, F, la distancia del foco a la placa fotográfica y r , el radio del anillo de difracción. En orden a conocer la resolución angular de la cámara calculamos primero la divergencia angular del haz incidente ϵ , que viene dada por los diámetros de los colimadores c_1 y c_4 y la distancia que los separa, que en la cámara de Kiessig es fija, es de 200 mm.

$$\epsilon = \frac{c_1 + c_2}{l} \quad \text{en nuestro caso} \quad \epsilon = \frac{0.3 + 0.2}{200} = 0.0025 \text{ rad}$$

Para colimadores con menor diámetro la intensidad de las reflexiones a bajo ángulo disminuye rápidamente.

La anchura del haz primario en el plano del film, suponiendo $\sin \theta \approx \theta$ (ángulos bajos) viene dada por:

$$S = \epsilon \cdot A + D$$

El diámetro de la placa interceptora, ϕ , obviamente debe ser mayor que S.

En nuestro caso hemos trabajado con distancias muestra-film de 100 y 500 mm teniendo

| | | |
|-------|----------------------|----------------------|
| A=100 | A ϵ +D=1.25 | ϕ =2.0 mm |
| A=500 | A ϵ +D=2.25 | ϕ =2.5 ó 3.0 mm |

La resolución alcanzada depende de las aberturas c_1 y c_2 de los colimadores utilizados así como de las distancias existentes entre los colimadores y entre la muestra y el film.

La resolución obtenida viene dada por:

$$\theta = \frac{S/2}{F} \approx \frac{S/2}{1\left(\frac{c_2}{c_1+c_2}\right)+A}$$

| | | |
|--------------|-------|---------------------------------|
| para el caso | A=100 | $\theta=6.9 \times 10^{-3}$ rad |
| | A=500 | $\theta=3.9 \times 10^{-3}$ rad |

y el espaciado mayor registrado se obtiene a partir de:

$$d = \frac{2\lambda A}{S + \frac{D+A\epsilon}{2}}$$

| | |
|-------|---------|
| A=100 | d=100 Å |
| A:500 | d=375 Å |

El espesor de las muestras utilizado fué de 0.5 a 1 mm, y el tiempo de exposición variable, entre 15 minutos para registrar la reflexión más intensa (001) en la dirección meridional y 45 horas para la reflexión más débil (004) en la dirección meridional.

El trabajo se realizó con una potencia de generador de 8 kW (200 mA/40 kW). En el recorrido del haz desde la muestra hasta la película se hizo vacío con objeto de eliminar el ennegrecimiento de la película debido al scattering de Rayos-X con las partículas de aire. Todas las exposiciones de MP están realizadas en éstas condiciones.

Los difractogramas fueron registrados en películas Kodirex de la Casa Kodak cuyas características son: granularidad 11×10^3 , densidad de ennegrecimiento media, velocidad del film para el Cu 38, factor del film 2.65%. El revelador utilizado fué el G-150 de Agfa-Gevaert y el tiempo de revelado de 5 minutos a la temperatura de 22°C.

Los registros fotográficos de difracción se fometraron, previo calibrado del aparato, con un microdensitómetro Joyce-Loebl MKIII, con una anchura de rendija efectiva de 90 μm o menos, siendo siempre menor del 5% de la anchura de la reflexión, utilizando las cuñas F-960, D-951 y A-784 de densidades ópticas 2.34, 1.67, y 0.90 respectivamente. Los brazos de ampliación fueron 1/20 y 1/50 según los casos. En la figura 2 se representan los anillos de difracción

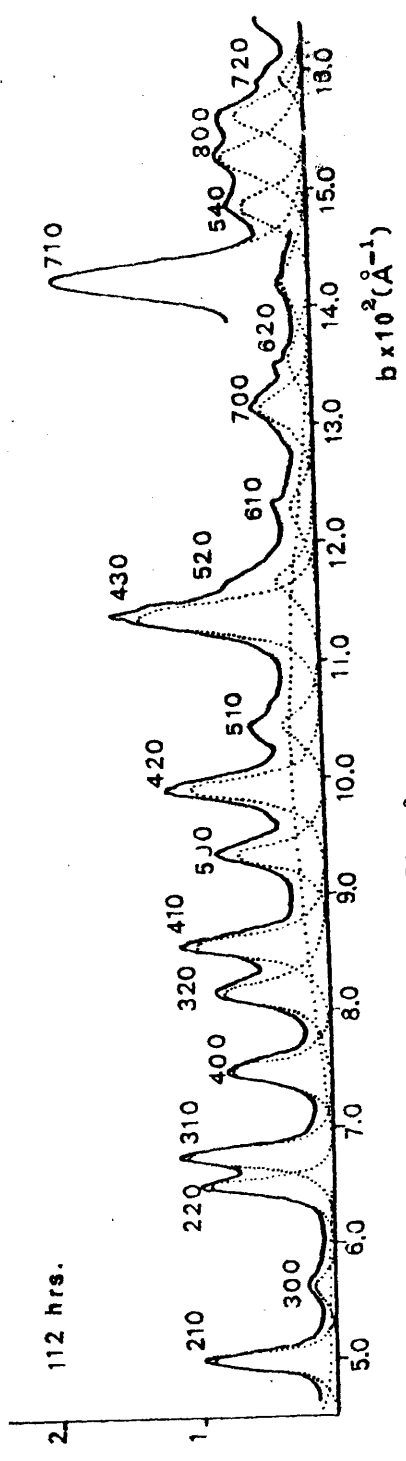
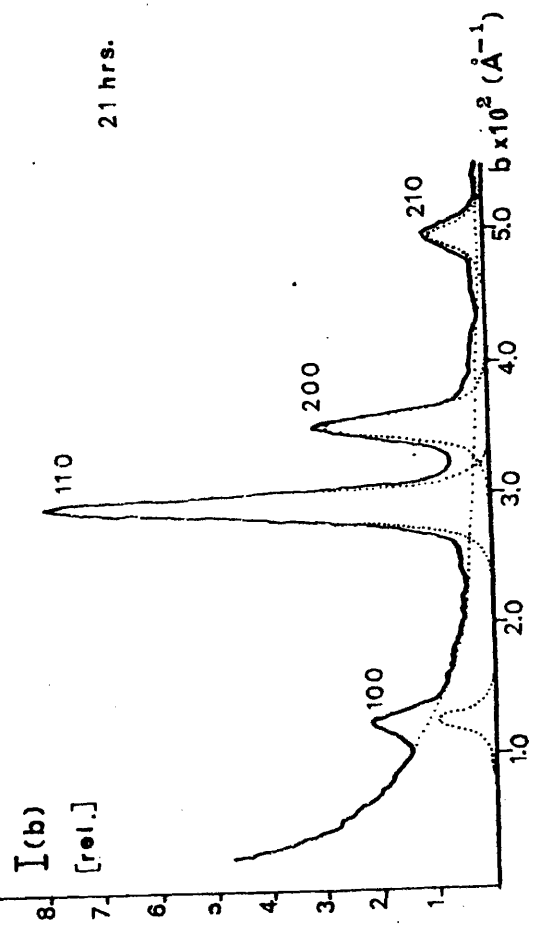
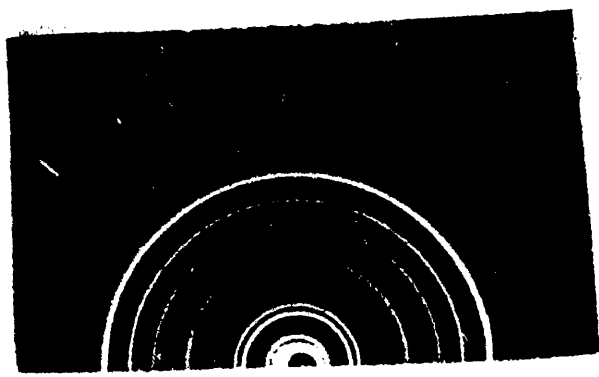


Fig. 2

registrados en la placa fotográfica y el perfil densitométrico correspondiente.

2.3. Análisis de los perfiles de difracción

Este análisis supone:

1. La separación del fondo o "background" debido a la difracción no coherente.
2. La resolución del solapamiento de las reflexiones separando la contribución de cada máximo y estudiando la forma de los perfiles.
3. Cálculo de las posiciones de los máximos.
4. Cálculo de las intensidades normalizadas y anchuras integrales corregidas de los picos.
5. Evaluación de la razón señal-ruido definida por el cociente entre las amplitudes de la señal y el ruido en una dirección dada.

La separación del fondo se realizó tomando una fotografía sin muestra con el mismo tiempo de exposición e idénticas condiciones de revelado que las utilizadas para la película obtenida en presencia de MP.

La separación de los máximos se llevó a cabo mediante un analizador de curvas Dupont, sobre el registro obtenido a partir de la lectura microdensitométrica de la placa fotográfica de MP. La figura 2 ilustra el resultado obtenido con este método de separación de las reflexiones que aparecen en la dirección equatorial.

Una vez realizada la separación de cada una de las reflexiones se estudiaron detalladamente la forma y posición de las mismas como veremos a continuación.

2.3.1. Estudio de la forma de los perfiles

Como es bien sabido la distribución de intensidades correspondiente a un máximo de difracción tiene un perfil natural que viene determinado fundamentalmente por la distribución de tamaños de cristal (factor de forma) y por la naturaleza y magnitud de las distorsiones de red (factor de red), así como por la distribución espectral de energía de la radiación incidente (corrección por los factores de Lorentz y polarización). En ausencia de estos factores los máximos corresponderían a picos muy agudos. El efecto de la cámara de difracción sobre el máximo puede ser analizado utilizando el teorema de superposición (12). De acuerdo con este teorema el perfil experimental del máximo observado $I_E(x)$ es la convolución del perfil sin distorsionar $I_R(x)$ y la función del perfil instrumental $I_I(x)$.

$$I_E(x) = \int_{-\infty}^{+\infty} I_I(y) I_R(x-y) dy \quad [1]$$

o en forma abreviada

$$I_E(x) = I_I(x) * I_R(x)$$

la función $I_I(x)$ expresa la suma total de los efectos del aparato sobre la función sin distorsionar. En nuestro caso considerando las condiciones de trabajo (ángulos bajos) y dado que las reflexiones aparecen dentro de un intervalo angular estrecho (0.8° y 1°) se puede aproximar $I_I(x)$ al perfil del haz primario (13).

La resolución de la ecuación [1] supone el conocimiento de la expresión analítica de las funciones I_R e I_I . Un método aproximativo para determinar la forma analítica de dichas curvas (14,15) consiste en evaluar el cociente $\delta\beta/\delta\beta^{\frac{1}{2}}$ donde

$$\delta\beta = \frac{\int_{-\infty}^{+\infty} I(x) dx}{I_{\max}(x)} \quad [2]$$

$\delta\beta$ es la anchura integral y $\delta\beta^{\frac{1}{2}}$ es la anchura de la curva a mitad de altura. En la figura 3 se encuentran representados valores de $\delta\beta/\delta\beta^{\frac{1}{2}}$ en función del vector b de la red recíproca, ($b=2 \text{ sen } \theta/\lambda$) para las primeras reflexiones que aparecen separadas en la dirección ecuatorial. El valor promedio de $\delta\beta/\delta\beta^{\frac{1}{2}}=1.15$ para los distintos valores de b , se aproxima más al valor correspondiente a un perfil Lorentz cuadrado (~ 1.21) que al de una gaussiana (~ 1.06). Posteriormente se ensayaron los dos tipos de perfiles en el analizador de curvas obteniéndose con el perfil de Lorentz cuadrado una aproximación al área del 96% mientras que con el perfil gaussiano la aproximación era del 94%.

Para el haz primario se consideró también un perfil tipo Lorentz cuadrado.

La separación del doblete K_{α_1} , K_{α_2} no se consideró en nuestro caso ya que al trabajar a ángulos bajos su corrección es despreciable (16).

2.3.2. Determinación de la posición de las reflexiones

La posición de las reflexiones puede ser definida bien por la posición de su centro de gravedad (media de la distribución)

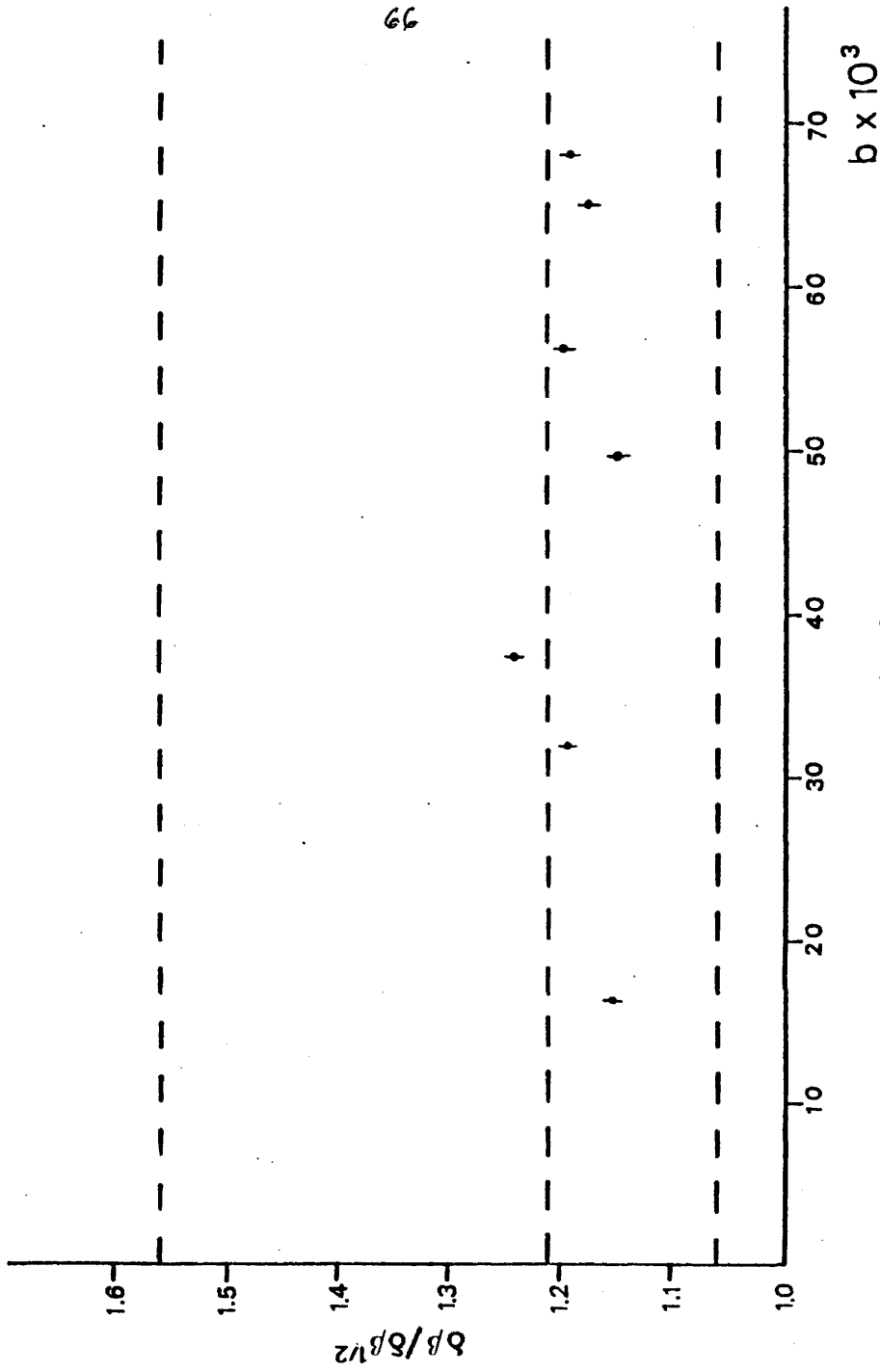


Fig. 3

o por la posición del máximo (moda de la distribución). La diferencia entre ambas medidas depende fundamentalmente de las condiciones de registro empleadas (12). En nuestro caso el parámetro de asimetría es cero y la diferencia entre ambas medidas es despreciable.

La posición en grados (θ) viene dada por la expresión

$$\theta = \frac{1}{2} \text{ arc tg } \frac{r/D}{\ell} \quad [3]$$

donde r es la posición del máximo en el registro densitométrico (su medida viene afectada por un error de ± 0.5 mm), D el brazo de ampliación empleado y ℓ la distancia de la muestra al film que fué determinada mediante el calibrado con una muestra patrón de parafina C_{36} , obteniéndose los valores de 100.00 ± 0.05 mm y 500.0 ± 0.3 mm. para los casos de distancias 100 y 500 respectivamente.

2.3.3. Medida de la intensidad difractada

La distribución de intensidad no puede ser registrada para ángulo cero y sus proximidades. Ante este hecho se plantean dos posibilidades; extrapolar el valor de la intensidad para el pico de orden cero o cancelar la contribución del mismo. En el primer caso las intensidades de las reflexiones vendrán dadas en una escala absoluta, mientras que el segundo caso vendrán en una escala relativa. Al trabajar con intensidades absolutas se obtiene un perfil de intensidad electrónica real, mientras que si lo hacemos con intensidades relativas lo que se obtiene es la modulación del perfil (17).

La información que interesa en el estudio de membranas tal como distancia entre bicapas y contribución de lípidos y protei-

nas al perfil de densidad electrónica, puede obtenerse trabajando en una escala relativa. Este hecho unido a la dificultad que plantea el trabajar en una escala absoluta hizo que nos decidiéramos por trabajar en una escala relativa, referida al pico más alto que aparece en cada una de las direcciones ecuatorial y meridional.

Como los diagramas de difracción presentan arcos, es necesario encontrar la integral de la distribución de intensidad (18). Esto se realiza mediante medidas densitométricas de los arcos en distintas direcciones tal como se muestra en la figura 4 para el caso de la reflexión (001).

2.3.4. Corrección por los factores de polarización y Lorentz

La radiación procedente del generador está sin polarizar mientras que la radiación difractada está polarizada dependiendo del ángulo de difracción (12). De acuerdo con la teoría clásica de Thompson la energía total del haz difractado es proporcional al factor $1/2 (1 + \cos^2 2\theta)$. La corrección por este factor debe hacerse siempre que la radiación incidente sobre la muestra esté sin polarizar.

La corrección de Lorentz es debida a la divergencia del haz y a que éste no es estrictamente monocromático. El factor de Lorentz para sistemas lamelares fué calculado por Porod en 1951 (19) obteniendo el valor de $1/b^2$ siendo $b=2 \sin \theta/\lambda$.

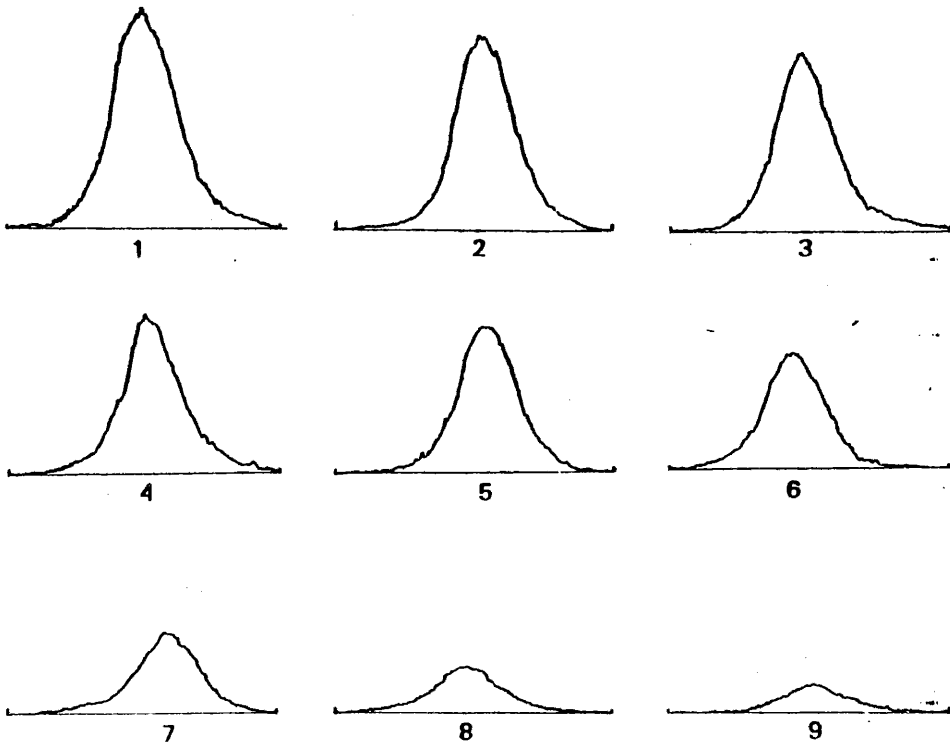
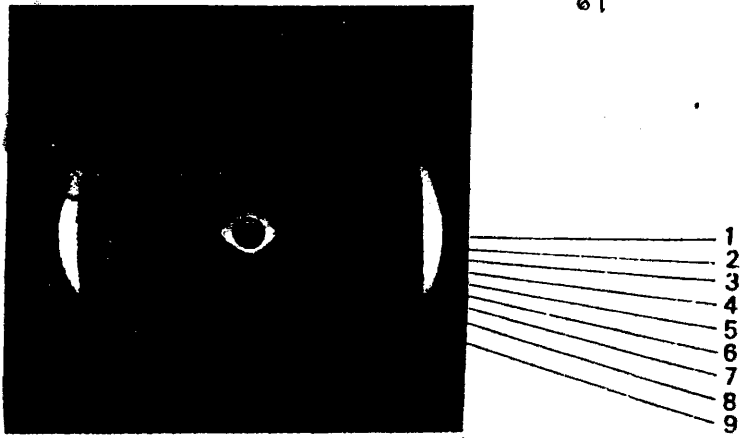


Fig. 4

BIBLIOGRAFIA

1. Oesterhelt, D., Stoeckenius, W., Nature New Biol. 233, 149 (1971).
2. Oesterhelt, D., Stoeckenius, W.; Methods in Enzymol. 31, (H), 8090 (1971)
3. Becher, B.M., Cassin, J., Preparative Biochem. 5, (2) (1975)
4. Fernández Tordesillas, C., Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid (1977)
5. Worthington, C.R., J. Biol. Phys. 2, 1 (1974)
6. Worthington, C.R., J. Sci. Instr., 33, 66 (1956)
7. Kiessig, H., Kolloid Z., 98, 213 (1942)
8. Kratky, O, Z. Elektrochem., 58, 49 (1956)
9. Franks, A., Proc. Phys. Soc., 688, 1054 (1958)
10. Beereman, D.W. Rev. Sci. Instr., 26, 1048 (1955)
11. Kiessig, H., Sci. 11, 433 (1953)
12. Klug, H.P., Alexander, L.E., "X-Ray Diffraction Procedures for Polycrystalline and Amorphous Materials", 2^a Edición, Wiley (1974)
13. Fernández Bermúdez, S., Loboda-Cacković, J., Hosemann, R., Z. Naturforsch., 32C, 362 (1977)
14. Vogel, E., Tesis Doctoral, Universidad de Berlín (1971)
15. Martínez de Salazar, J., Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid (1979)
16. Lesslauer, W., Acta Cryst. B30, 1932 (1974)
17. Kreutz and Pape, "The Physics of Biological Membranes", Edited by Konrad Colbow (1975)
18. Kakudo, N., Kasai. "X-Ray Diffraction by Polymers". Ed. Elsevier (1972)
19. Porod, G., Kolloid-Zeitschrift, 124, 83 (1951)

71

3. RESULTADOS

3.1. Descripción del diagrama de difracción de MP

El diagrama de difracción de muestras de MP seca, haciendo incidir el haz de Rayos-X en dirección perpendicular al plano de la membrana, consiste en una serie de anillos que se extienden desde espaciados de 53.2 Å hasta 3.5 Å. Los de mayor intensidad se encuentran situados a 30.7 Å, 26.6 Å y 8.9 Å. Las reflexiones medidas, así como sus posiciones expresadas en θ (grados), $b(\text{Å}^{-1})$ y $d(\text{Å})$ se encuentran recogidas en la Tabla I. Se observan también dos halos, uno difuso que se extiende entre los anillos, centrado a 10 Å (Cap.2, Fig.2) y otro en el extremo del diagrama cuyo máximo está a 4.6 Å.

Como veremos a continuación, las reflexiones se pueden indexar hasta 6 Å suponiendo una red hexagonal bidimensional en el plano de la membrana. Más del 90% de las reflexiones predichas para este tipo de celdilla pueden observarse en el diagrama de MP, no apareciendo ninguna reflexión extra.

Debido al hecho de que los diagramas de difracción de lípidos extraídos de MP (1,2) no presentan ninguna de las reflexiones discretas que aparecen en el caso de diagramas de MP, éstas se asocian con la distribución espacial de la proteína, BR, en el plano de la membrana (3).

Al hacer incidir el haz de Rayos-X paralelamente al plano de la membrana, sobre muestras parcialmente orientadas de MP, se obtiene un diagrama de difracción que presenta algunas novedades con respecto al obtenido en la dirección perpendicular (Fig. 1).

El diagrama consta de dos series de arcos, una situada sobre el ecuador y la otra en la dirección meridional. Los arcos situa

TABLA I

| indice | θ (°) | $b \times 10^3 (\text{\AA}^{-1})$ | d (Å) |
|--------|---------------|-----------------------------------|------------|
| 100 | 0.8294±0.0002 | 18.8±0.2 | 53.2±0.6 |
| 110 | 1.4398±0.0003 | 32.6±0.3 | 30.7±0.3 |
| 200 | 1.6597±0.0002 | 37.6±0.3 | 26.6±0.2 |
| 210 | 2.1987±0.0002 | 49.8±0.3 | 20.1±0.1 |
| 300 | 2.4895±0.0003 | 56.4±0.3 | 17.8±0.1 |
| 220 | 2.8752±0.0003 | 65.1±0.3 | 15.37±0.08 |
| 310 | 2.9925±0.0002 | 67.7±0.3 | 14.77±0.06 |
| 400 | 3.3225±0.0003 | 75.2±0.3 | 13.30±0.06 |
| 320 | 3.6257±0.0003 | 82.0±0.4 | 12.19±0.06 |
| 410 | 3.8060±0.0003 | 86.1±0.4 | 11.61±0.05 |
| 500 | 4.1521±0.0002 | 93.9±0.4 | 10.65±0.04 |
| 420 | 4.3964±0.0003 | 99.4±0.4 | 10.06±0.04 |
| 510 | 4.6311±0.0005 | 104.7±0.5 | 9.55±0.05 |
| 430 | 5.0515±0.0004 | 114.2±0.5 | 8.76±0.04 |
| 520 | 5.1874±0.0003 | 117.3±0.4 | 8.53±0.03 |
| 610 | 5.4503±0.0004 | 123.2±0.6 | 8.12±0.04 |
| 700 | 5.8157±0.0005 | 131.4±0.7 | 7.61±0.04 |
| 620 | 5.9979±0.0004 | 135.6±0.6 | 7.38±0.03 |
| 710 | 6.2777±0.0005 | 141.8±0.7 | 7.05±0.04 |
| 540 | 6.4954±0.0005 | 146.7±0.7 | 6.81±0.05 |
| 800 | 6.6564±0.0005 | 150.4±0.7 | 6.65±0.05 |
| 720 | 6.8034±0.0005 | 157.7±0.7 | 6.51±0.05 |
| 640 | 7.3140±0.0005 | 165.1±0.7 | 6.05±0.05 |

74

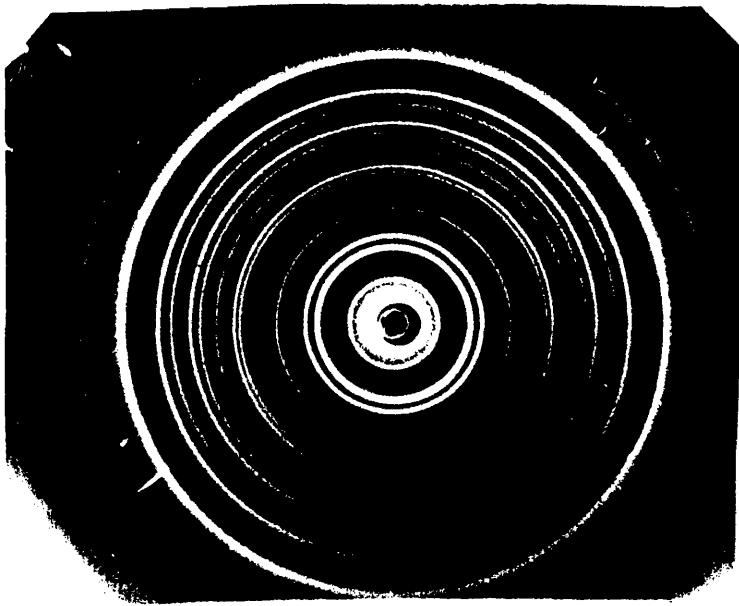


Fig. 1. Fotografía de la difracción de rayos X de la membrana Púrpura con el haz de rayos X incidente perpendicularmente al plano de la membrana. Tiempo de exposición: 112 horas. Distancia muestra film: 100 mm.

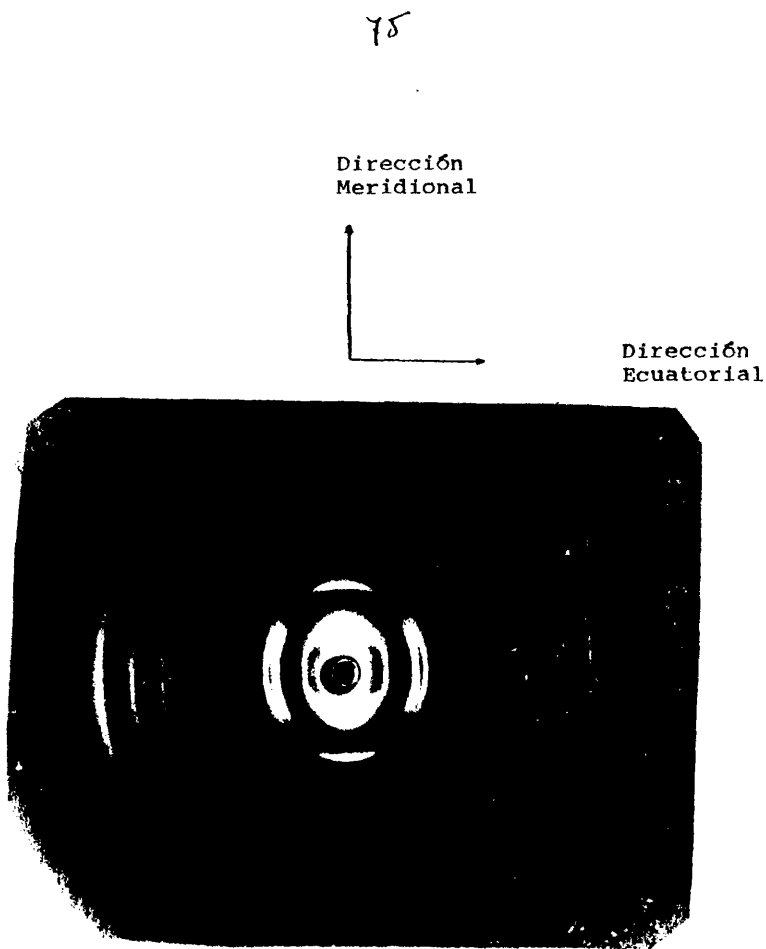


Fig. 2. Fotografía de la difracción de rayos X de la membrana Púrpura con el haz de rayos X incidente paralelamente al plano de la membrana. Tiempo de exposición: 45 horas. Distancia de muestra film: 100 mm.

dos en el ecuador presentan el mismo espaciado e idéntica relación de intensidad que los anillos de la figura 1. Los anillos son el resultado de promediar circularmente la intensidad que aparece en el ecuador en la figura 2. El hecho de que sean arcos indica una orientación tipo mosaico en los fragmentos de membrana.

Los arcos situados en el meridiano aparecen a espaciados $49/h$, siendo $h=1, 2, 4, 7, 10$. La intensidad de los tres últimos es mucho menor que la de los dos primeros. Su origen está en el empacamiento lamelar de las membranas en esa dirección. Se observa una difracción difusa entre ellos, que aumenta a medida que nos alejamos del centro, indicando un apilamiento imperfecto de las membranas.

A 4.6 y 10.0 \AA , en la dirección ecuatorial, aparecen los halos a los que nos hemos referido anteriormente y a 5 \AA , en la dirección meridional, aparece otro halo (Fig. 3) que se extiende por los cuadrantes hasta unirse con el ecuatorial de 4.6 \AA .

En los cuadrantes se observa algo de difracción difusa formando como estratos pero de intensidad mucho menor que la que aparece en las dos direcciones ya mencionadas.

3.2. Análisis en la dirección ecuatorial

3.2.1. Parámetros de la Celdilla Unidad

3.2.1a. Asignación de índices a las reflexiones

Conocidas con exactitud las posiciones de los máximos de difracción, se hace uso de un método analítico para identificar el sistema cristalográfico y averiguar los índices correspondientes a

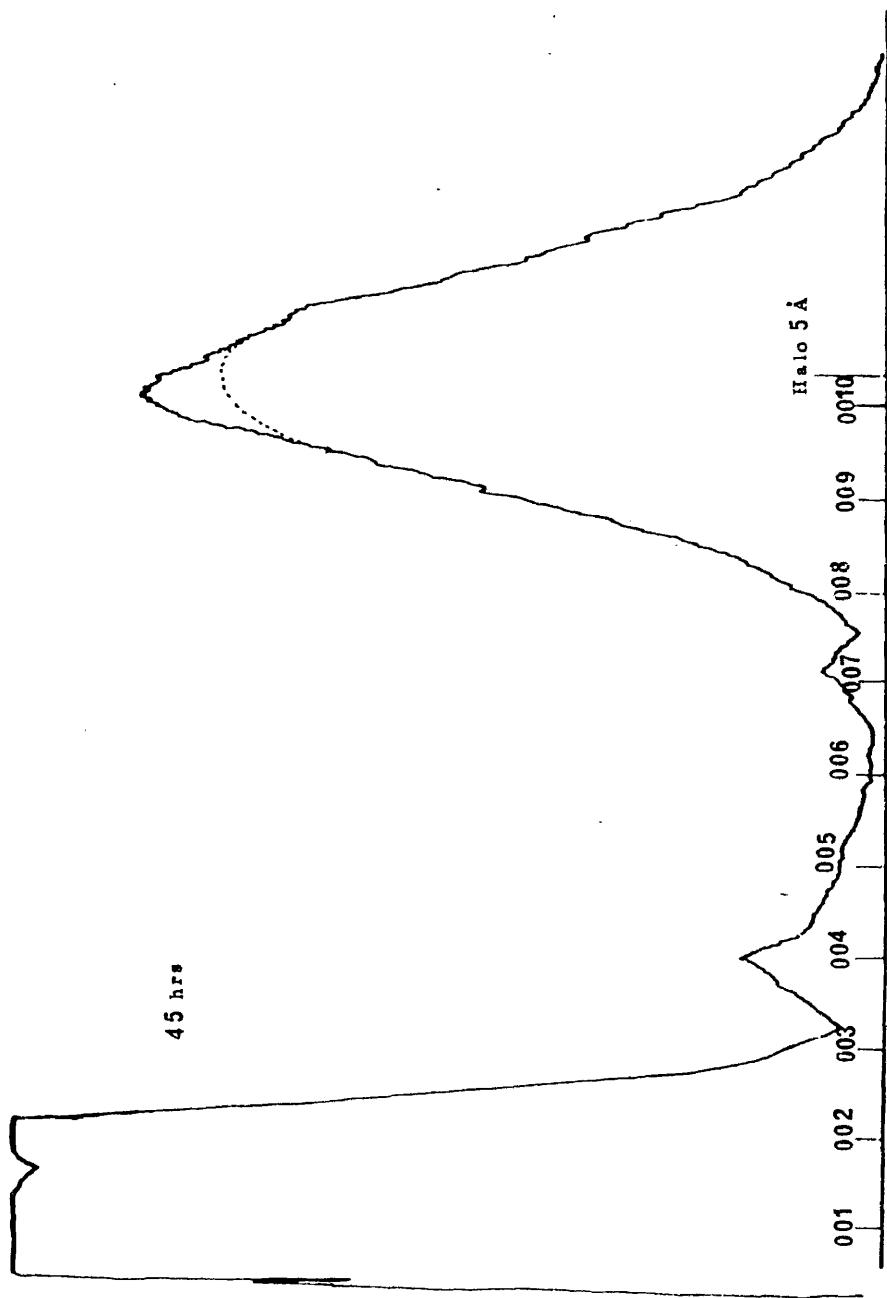


Fig. 3

cada reflexión. El ajuste es puramente geométrico pues al no existir orden cristalino tridimensional en el apilamiento de membranas no se le puede asignar un grupo espacial con total seguridad, sin embargo el grupo planar correspondiente a la proyección de la materia difractante en la dirección (001) ha sido determinado.

La elección del sistema hexagonal se basa en el hecho de que micrografías de membrana en estado seco, presenta superficies de fractura que forman entre sí ángulos de 60 y 120 grados (4).

En el sistema hexagonal la relación entre $\text{sen}^2 \theta$ (θ ángulo de Bragg) y los índices h, k, ℓ , de cada reflexión viene dada por la expresión:

$$\text{sen}^2 \theta = A (h^2 + h k + k^2) + C \ell^2 \quad |1|$$

con $A = \lambda^2/3 a^2$ y $C = \lambda^2/4 c^2$

donde λ es la longitud de onda de los Rayos-X y, a y c son los parámetros de la celdilla unidad (5).

En el plano de la membrana, dirección ecuatorial, como $\ell=0$ tenemos entonces que $\text{sen}^2 \theta / (h^2 + h k + k^2) = \lambda^2/3 a^2$ es constante.

Dado que los valores posibles para $h^2 + h k + k^2$ se encuentran tabulados (6) buscando la relación constante indicada anteriormente para cada línea del diagrama, se pueden asignar índices a cada reflexión.

Los espaciados experimentales ajustan perfectamente una celdilla hexagonal (Tabla II) observándose ausencias solamente en el caso de las líneas 330, 440 y 600.

TABLA II

| d_{exp} | d_{cal} |
|------------------|------------------|
| 53.2 | 53.6 |
| 30.7 | 30.6 |
| 26.6 | 26.6 |
| 20.1 | 20.1 |
| 17.8 | 17.8 |
| 15.4 | 15.4 |
| 14.8 | 14.8 |
| 13.3 | 13.3 |
| 12.2 | 12.2 |
| 11.6 | 11.6 |
| 10.7 | 10.7 |
| 10.1 | 10.1 |
| 9.6 | 9.6 |
| 8.8 | 8.8 |
| 8.5 | 8.5 |
| 8.1 | 8.1 |
| 7.6 | 7.6 |
| 7.4 | 7.4 |
| 7.1 | 7.1 |
| 6.8 | 6.8 |
| 6.7 | 6.7 |
| 6.5 | 6.5 |
| 6.1 | 6.1 |

3.2.1b. Dimensiones de la celdilla unidad

Para una celdilla unidad hexagonal ($a=b \neq c$, $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$) los parámetros de celdilla pueden calcularse a partir de los valores experimentales de θ , utilizando cualquiera de las reflexiones, mediante la expresión:

$$a = \left[\frac{\lambda^2 (h^2 + h k + k^2)}{3 \sin^2 \theta} \right]^{\frac{1}{2}} \quad |2|$$

$$\Delta a = \cotg \theta \sin \theta \Delta \theta \left(\lambda^2 (h^2 + h k + k^2) / 3 \right)^{\frac{1}{2}}$$

En la Tabla III se muestran los valores obtenidos para a , a partir de los valores experimentales de θ .

Aunque los errores sistemáticos disminuyen al aumentar θ (7), en nuestro caso y debido a que las primeras reflexiones están mejor definidas y son más intensas, hemos tomado como valor de a el promedio, obteniéndose:

$$a = 61,45 \pm 0,09 \text{ \AA}$$

El valor de c se obtiene a partir del espaciado de las reflexiones que aparecen en la dirección meridional obteniéndose un valor de:

$$c = 48,9 \text{ \AA} \pm 0,1$$

Conocidos a y c el volumen de la celdilla unidad se deduce inmediatamente, resultando

$$v = 159,900 \text{ \AA}^3$$

TABLA III

| índice | a |
|--------|-------|
| 100 | 61.50 |
| 110 | 61.36 |
| 200 | 61.47 |
| 210 | 61.39 |
| 300 | 61.48 |
| 220 | 61.48 |
| 310 | 61.48 |
| 400 | 61.44 |
| 320 | 61.36 |
| 410 | 61.45 |
| 500 | 61.47 |
| 420 | 61.45 |
| 510 | 61.38 |
| 430 | 61.49 |
| 520 | 61.48 |
| 610 | 61.46 |
| 700 | 61.49 |
| 620 | 61.43 |
| 710 | 61.49 |

$$\bar{a} = 61.45 \pm 0.09$$

3.2.1c. Número de moléculas de proteína por celdilla

Si se conoce la densidad de la membrana y el peso molecular de la proteína, cómo sucede con la BR, se puede calcular el número de moléculas de proteína que hay por celdilla.

La densidad de MP calculada por primera vez por Stoeckenius y Kunan en 1968 (8), fué confirmada posteriormente (9) siendo su valor $\rho=1.18 \text{ gr/cm}^3$, con lo cual la masa contenida en la celdilla unidad $A=\rho V=188.697 \times 10^{-24} \text{ grs}=113.652 \text{ Dalton}$.

Cómo el 75% de la masa de la membrana corresponde a la masa de la proteína (8) tenemos 85.239 Dalton de proteína y 28413 Dalton de lípidos por celdilla unidad. El peso molecular de la BR es 26.000 Dalton (2) con lo que se obtiene que el número de moléculas de proteína por celdilla unidad es $3.3 \approx 3$.

3.2.1d. Grupo planar

Debido a que los espaciados hasta 6 \AA se corresponden con los de una celdilla unidad hexagonal, el número de posibles empaquetamientos está limitado a los existentes en el sistema hexagonal.

Grupos con planos y centros de simetría no son posibles en los empaquetamientos de proteínas (10), de los grupos que restan sólo el P3 contiene tres moléculas por celdilla unidad, todos los demás tienen 6 ó 12.

Se concluye pues que el empaquetamiento debe ser hexagonal P3.

3.2.2. Tamaño y Perfección de los Microcristales de Membrana Púrpura

La frecuente pérdida de orden de largo alcance en la red cristalina como consecuencia de irregularidades estructurales y de empaquetamiento provoca un estado "pseudocristalino" o "paracristalino" que le aleja de la condición de cristal perfecto (11,12) (Cap. 1, 2).

Abordaremos pues, directamente los resultados obtenidos en el caso del empaquetamiento de BR en la MP.

El estudio paracristalino requiere el conocimiento de las anchuras integrales de las reflexiones. Esta medida se hizo a partir del registro de densidad óptica obtenido empleando un microdensitómetro Joyce-Loebl. Los perfiles fueron resueltos posteriormente mediante un curvo-analizador. En la Tabla IV se dan los valores de la intensidad en unidades relativas y de la anchura integral para las distintas reflexiones que aparecen en la dirección ecuatorial.

En la dirección $[100]$ el estudio se ha llevado a cabo teniendo en cuenta los siete órdenes de difracción que aparecen en esta dirección, siendo la primera vez que se consiguen tantos órdenes en el caso de un paracristal.

Si asumimos que el factor de forma al cuadrado S y el factor de red Z presentan un perfil de Lorentz, la anchura integral $\delta\beta_{hkl}$ en la dirección $h k l$ se expresa (13)

$$\delta\beta_{hkl} = \frac{1}{D_{hkl}} + \frac{(\pi g m)^2}{d_{hkl}} \quad |3|$$

84

TABLA IV

| índice | $I_{\text{corregida y normalizada}}$ | $\delta\beta_{\text{exp}} \times 10^3 (\text{\AA}^{-1})$ | $\delta\beta_{\text{correg}} \times 10^3 (\text{\AA}^{-1})$ |
|--------|--------------------------------------|--|---|
| 100 | 13.2 | 1.6±0.2 | 1.2±0.2 |
| 110 | 100.0 | 1.7±0.2 | 1.3±0.2 |
| 200 | 37.9 | 1.8±0.2 | 1.4±0.2 |
| 210 | 14.5 | 1.8±0.2 | 1.4±0.2 |
| 300 | 1.1 | 2.1±0.2 | 1.8±0.2 |
| 220 | 16.1 | 1.9±0.2 | 1.5±0.2 |
| 310 | 18.2 | 2.0±0.2 | 1.7±0.2 |
| 400 | 12.1 | 2.1±0.1 | 1.8±0.1 |
| 320 | 13.7 | 2.4±0.2 | 2.1±0.2 |
| 410 | 17.0 | 2.4±0.2 | 2.1±0.2 |
| 500 | 12.9 | 2.4±0.2 | 2.1±0.2 |
| 420 | 17.9 | 2.6±0.2 | 2.2±0.2 |
| 510 | 6.0 | 3.3±0.3 | 3.0±0.3 |
| 430 | 25.3 | 3.7±0.2 | 3.4±0.2 |
| 520 | 4.5 | 3.1±0.5 | 2.8±0.5 |
| 610 | 3.8 | 4.7±0.5 | 4.5±0.5 |
| 700 | 7.4 | 3.8±0.3 | 3.5±0.3 |
| 620 | 2.8 | 4.0±0.5 | 3.7±0.5 |
| 710 | 3.9 | 4.4±0.5 | 4.2±0.5 |
| 800 | 2.6 | 4.1±0.3 | 3.8±0.3 |

razón señal/ruido = 220

dónde D_{hkl} es el tamaño de cristal en la dirección hkl , d_{hkl} es el espaciado interplanar, g_{hkl} el factor de paracristalinidad y m el orden de la reflexión.

La figura 4 ilustra la variación de la anchura integral $\delta\beta$ en función del cuadrado del vector b de la red recíproca ($b=2 \sin \theta / \lambda$).

La representación de $\delta\beta$ frente a b (Fig. 5) muestra un aumento cuasi parabólico lo que sugiere que la contribución de defectos de primera especie a la anchura observada es despreciable.

A partir de la expresión 3 se han calculado los valores D_{hkl} y g_{hkl} en las direcciones $[100]$, $[110]$, $[210]$ y $[310]$. En la Tabla V se encuentran representados los valores de g y D en las distintas direcciones.

TABLA V

| planos reticulares | d (Å) | g (%) | D (Å) |
|-----------------------|----------------|---------------|----------------|
| (100) | 53.2 ± 0.6 | 1.5 ± 0.1 | 850 ± 100 |
| (110) | 30.7 ± 0.3 | 1.0 ± 0.5 | 920 ± 140 |
| (210) | 20.1 ± 0.1 | 2.2 ± 0.6 | 940 ± 250 |
| (310) | 14.8 ± 0.1 | 3.1 ± 0.8 | 1150 ± 400 |

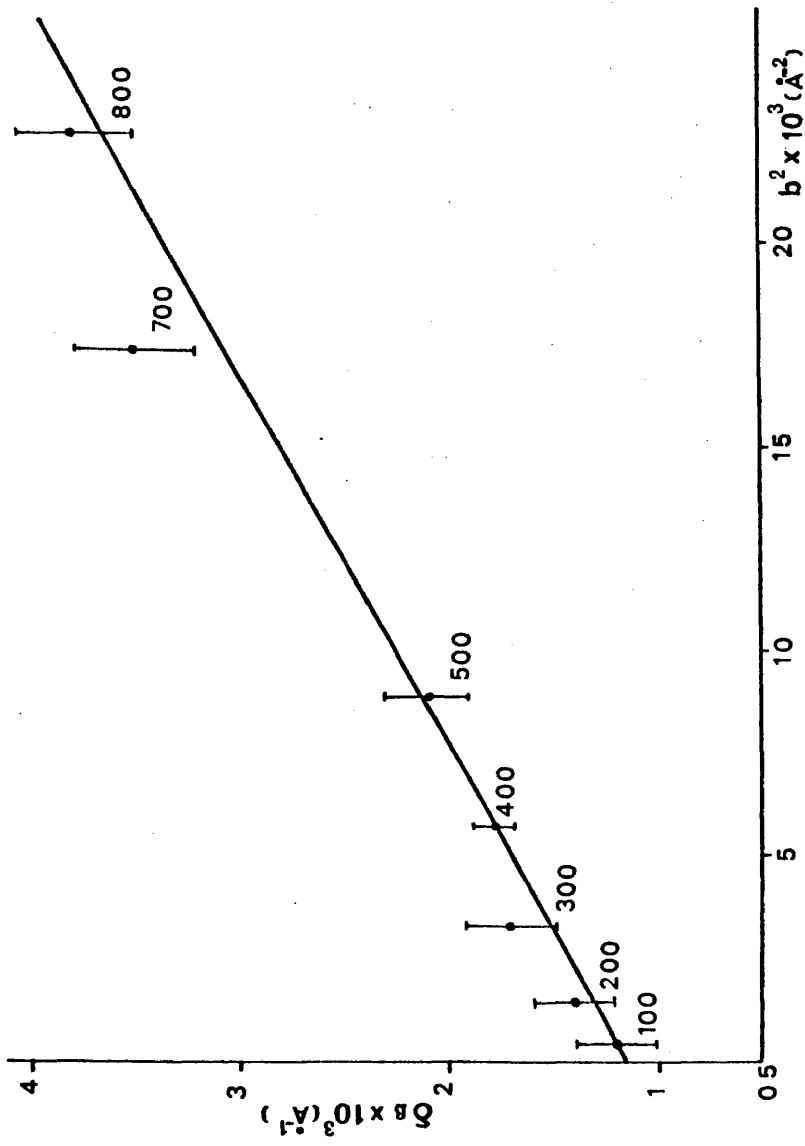


Fig. 4

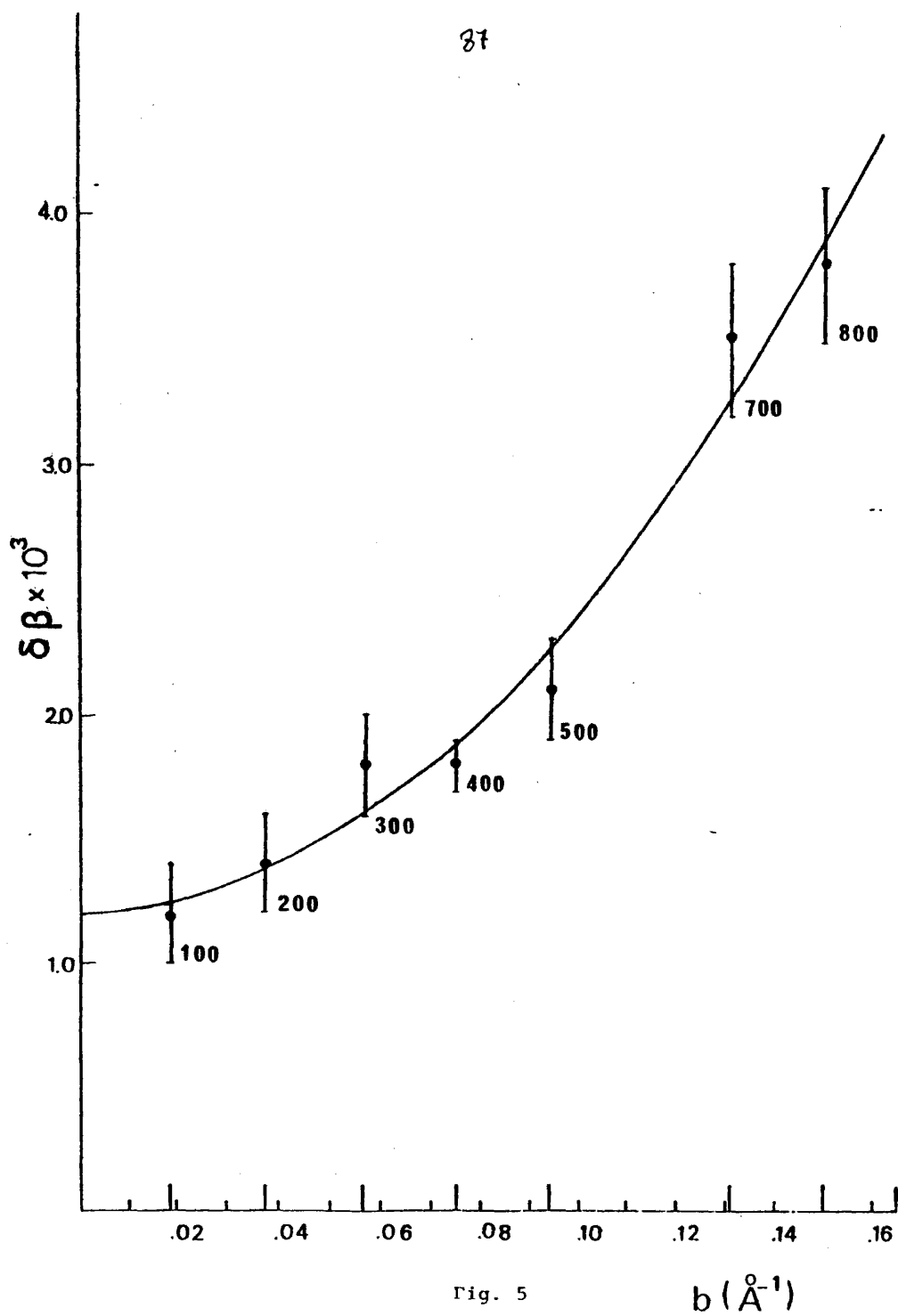


Fig. 5

$b (\text{\AA}^{-1})$

3.2.3. Distribución de BR en MP. Justificación de la Intensidad Difractada en la Dirección Ecuatorial

Debido a su complejidad, el estudio de la estructura de una proteína suele desarrollarse mediante una serie de aproximaciones graduales, con las cuales se consigue información parcial acerca del número de cadenas que forman la molécula, distribución espacial y distancia promedio entre las mismas, etc. Esta información resulta de gran utilidad cuando se trata de dilucidar posteriormente la estructura primaria de la proteína.

Hay dos métodos a través de los cuales se pueden deducir características estructurales, partiendo de los datos de difracción. El primero se basa en el ajuste de la intensidad experimental con la intensidad calculada a partir de un modelo teórico, en el cual se asigna a las partículas una forma, tamaño y ordenamiento dados; si el ajuste es adecuado, el modelo utilizado es elegido como solución. El segundo método requiere el conocimiento de la intensidad difractada por un elemento individual de la muestra, en la misma escala que la observada para la agrupación de unidades difractantes.

La distribución de intensidad que aparece en el caso de la MP en la dirección ecuatorial proviene de la disposición ordenada de la proteína BR, en el plano de la membrana, pues si se compara el diagrama de MP con el de los lípidos extraídos de esta membrana, se observa que en el último caso no aparecen los máximos discretos que se observan cuando la muestra es MP (1).

Siguiendo en primer método antes señalado, desarrollaremos un modelo en el que a partir de la distribución de la proteína en la

membrana, se calcula la intensidad en la dirección ecuatorial.

Hay pocos precedentes de construcción de un modelo matemático para estudiar difracción de una proteína de membrana, entre otras causas debido a que no es frecuente encontrarlas dispuestas de una forma ordenada dentro de la membrana. Muy diferente es el caso de las proteínas fibrosas; la relativa facilidad con la que se puede obtener una fibra las ha convertido en intenso objeto de estudio, desarrollándose ampliamente la teoría de difracción para este tipo de moléculas en los últimos años (14,21). Los trabajos con polipéptidos (22,23), queratina (24), miosina (25) etc. muestran los avances conseguidos en la interpretación de los diagramas de este tipo de estructuras.

En el presente trabajo hemos ensayado distintos modelos con diferentes resultados, como se verá a continuación. Algunos de los parámetros de los modelos se obtienen directamente de los diagramas de difracción (dimensiones de la celdilla, número de moléculas por celdilla, distancia promedio entre α -hélices, posición de los máximos), otros se basan en resultados obtenidos por otros investigadores con diferentes técnicas experimentales (proteína formada por siete α -hélices (26,31) disposición del monómero perpendicularmente al plano de la membrana (26,30).

3.2.3a. Modelos matemáticos

En todos los modelos se hacen tres aproximaciones; la primera considera que un segmento α -hélice en la proteína difracta como una varilla (cilindro lleno) (27), la segunda presupone simetría cilíndrica en estos segmentos (28) y en la tercera se considera que

la longitud de onda de los Rayos-X es despreciable frente a la longitud de las cadenas (29).

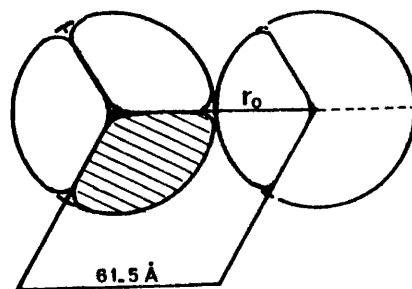


Fig. 6

En el modelo más sencillo se consideran los trímeros de proteína (3 situados en los vértices de una celdilla hexagonal. La Fig. 6 muestra una sección transversal de este modelo. Suponemos que el trímero tiene densidad uniforme y difracta como una varilla de radio r_0 , la separación entre trímeros viene dada por el valor obtenido experimentalmente para el lado de la celdilla, en este caso 61.5 \AA .

De acuerdo con la ecuación I-45 la intensidad viene dada por:

$$I(b) = |F|^2 G_N(b) =$$

$$I(b) = \frac{1}{16} \left[r_0 \frac{J_1(2\pi r_0 b)}{b} \right]^2 [4 + 10 J_0(2\pi a b) + 2 J_0(2\sqrt{3}\pi a b)]^2 \quad |4|$$

Los cálculos se efectuaron en el intervalo $b=0.02 \text{ \AA}^{-1}$ hasta $b=0.15 \text{ \AA}^{-1}$; el resultado obtenido puede verse representado en la Fig. 7. La intensidad calculada se ajustó a la obtenida experimentalmente, de manera que las curvas coincidieran en la reflexión con $b=0.032 \text{ \AA}^{-1}$. Los parámetros con los que se logró el mejor ajuste son $r_0=29.2 \text{ \AA}$ y $a=61.5 \text{ \AA}$.

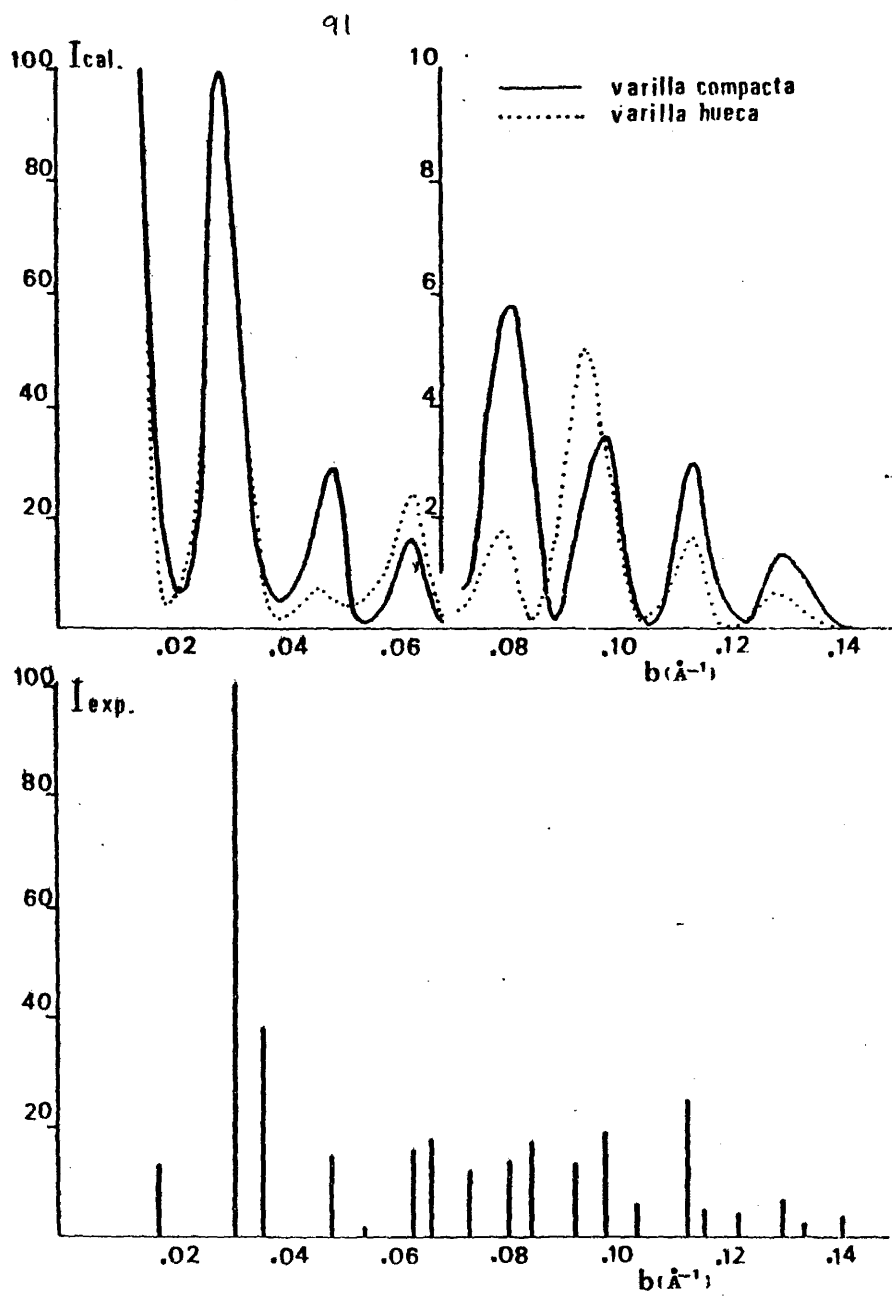


Fig. 7

Se consideró también la aproximación del trímero de proteina como una varilla hueca, en este caso la densidad electrónica vendría dada por:

$$\rho = \begin{cases} 1 & r' \leq r \leq r_0 \\ 0 & r' > r > r_0 \end{cases}$$

y la amplitud difractada

$$F(b) = r_0^2 \frac{J_1(2\pi r_0 b)}{b} - r' \frac{J_1(2\pi r' b)}{b} \quad |5|$$

La intensidad calculada con este modelo muestra una menor coincidencia con la I_{exp} que en el caso anterior, lo que parece indicar que las tres moléculas de proteína se agrupan de una manera compacta para formar el trímero (Fig. 7)

En el tercer modelo partimos de la estructura del monómero de proteína, formado por siete α -hélices dispuestas perpendicularmente al plano de la membrana (30,31). Considerando las α -hélices como varillas paralelas de radio r_0 , la intensidad difractada debida al monómero sería:

$$I(b)_M = |F_C|^2 G_{N_1}(b) \quad |6|$$

con $G_{N_1}(b) = \sum_{m,m'} J_0(2\pi r_{mm'} b)$ y F_C la amplitud difractada por una α -hélice; J_0 es la función de Bessel de orden cero y $r_{mm'}$ la distancia promedio entre α -hélices.

Al agrupar las proteínas en trímeros, la intensidad viene dada por:

$$I(b)_T = N_2 \left[\overline{|F_T|^2} - \overline{|F_T|^2} + \overline{|F_T|^2} G_{N_2}(b) \right] \quad |7|$$

siendo N_2 el número de monómeros, en nuestro caso tres, y

$G_{N_2} = \sum_{p, p'} J_0(2\pi r_{pp'} b)$ con $r_{pp'}$ de distancia entre monómeros.

$$\overline{|F_T|^2} = F_C^2 G_{N_1}(b) \quad \overline{|F_T|^2} = F_C^2 B_{N_1}^2(b),$$

con $B_{N_1} = \sum_1^3 J_0(2\pi r_p b)$ donde r_p es la posición de los monómeros;

la intensidad difractada es entonces:

$$I(b)_T = N_2 F_C^2 \left[\overline{G_{N_1}}(b) - B_{N_1}^2(b) \right] + F_C^2 B_{N_1}^2(b) G_{N_2}(b) \quad |8|$$

El paso siguiente es considerar los trímeros agrupados en un empaquetamiento hexagonal, obtenemos así:

$$I(b) = N_3 \left[N_2 (F_C^2 G_{N_1} - F_C^2 B_{N_1}^2) + F_C^2 B_{N_1}^2 G_{N_2} - F_C^2 B_{N_1}^2 B_{N_2}^2 \right] + F_C^2 B_{N_1}^2 B_{N_2}^2 G_{N_3}$$

|9|

donde N_3 es el número de trímeros por celdilla y $B_{N_2} = J_0(2\pi r_n b)$ correspondiendo r_n a la posición de los trímeros dentro de la celdilla unidad;

$G_{N_3} = \sum_{q, q'} J_0(2\pi r_{qq'} b)$ siendo $r_{qq'}$ distancia entre trímeros.

Los parámetros calculados (Fig. 8) resultan:

$$r_o = 4.15 \text{ \AA}$$

$$\bar{r}_{mm'} = 9.9 \text{ \AA}$$

$$\bar{r}_{pp'} = 29.0 \text{ \AA}$$

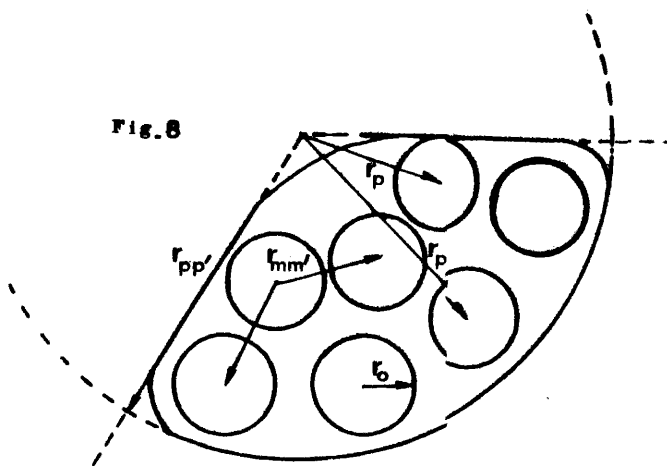
$$\bar{r}_{qq'} = 61.5 \text{ \AA}$$

$$r_p = 13 \text{ \AA}$$

$$r_p = 23 \text{ \AA}$$

$$r_h = 17.5 \text{ \AA}$$

Fig. 8



La figura 9 muestra la intensidad calculada frente a la experimental, cómo en los casos anteriores I_{cal} e I_{exp} se ajustaron de manera que coincidiesen para $b=0.032 \text{ \AA}$.

3.2.3c. Banda difusa centrada en 10 \AA

Desde los primeros trabajos de Perutz, Crick y Corey (32-36) con polipéptidos y proteínas fibrosas se encontró que era característico de los diagramas de estas sustancias, la presencia de una banda de difracción en la dirección ecuatorial, centrada alrededor de 10 \AA , además de dos picos de difracción marcados a 5.15 \AA y 1.5 \AA (Perutz sitúa esta banda en 10.5 para el polipéptido Pdy- γ -benzil-L-glutamato, Pauling y Corey en 9.8 para la α -queratina y Crick en 10.0 para la hemoglobina). Como se vio que lo común a todas estas sustancias era la estructura en α -hélice, se asoció ese halo con este tipo de estructura, concretamente con la distancia promedio entre cadenas α -hélices.

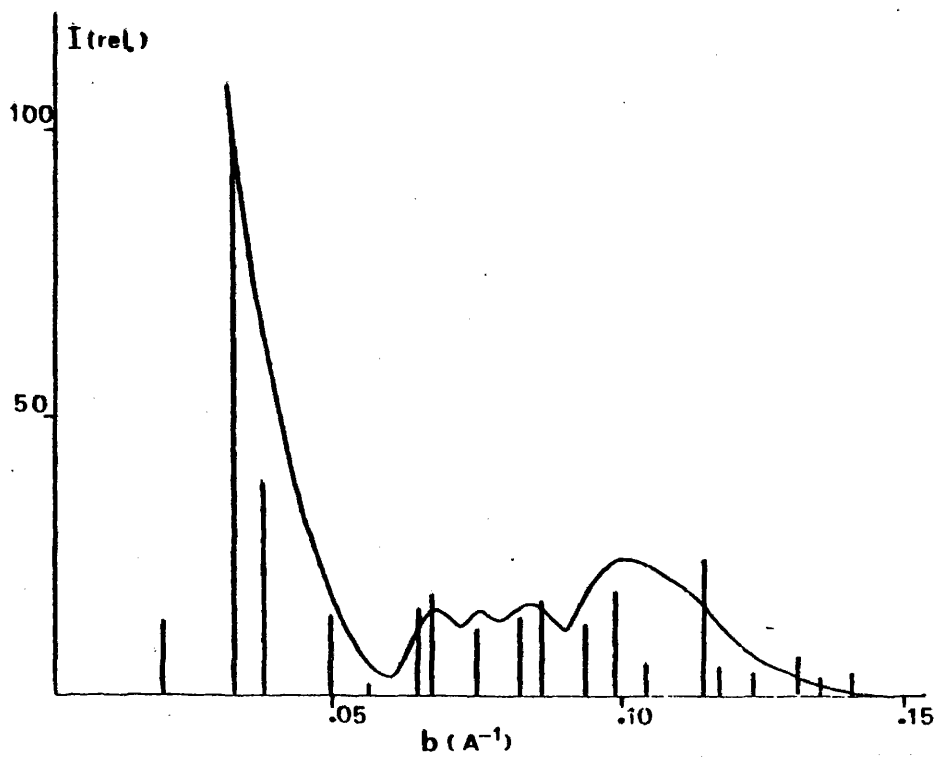


Fig. 9

Basándonos en estos datos y debido a que en la fórmula |9| el primer término tiene en cuenta la contribución de las α -hélices a la intensidad, y se presenta como un término aditivo, hemos separado el halo difuso en el registro de I_{exp} y ajustado este mediante la ecuación:

$$I(b) = F_C^2 G_N \quad |10|$$

F_C^2 = factor de estructura de un segmento α -hélice

$G_N(b)$ tiene en cuenta las siete α -hélices en la proteína, siendo la función interferencia en este caso:

$$G_N(b) = 7 + 22 J_0(2\pi r_{mm}, b) + 6 J_0(4\pi r_{mm}, b) + \\ 2 J_0(6\pi r_{mm}, b) + 8 J_0(2\pi\sqrt{3} r_{mm}, b) + 4 J_0(2\pi\sqrt{7} r_m b)$$

r_{mm} = distancia promedio entre α -hélices = 9.9 \AA

Cómo puede inferirse a partir de la concordancia entre I_{exp} e I_{cal} (Fig. 10), la distribución de la α -hélice dentro de la proteína explica la presencia del halo difuso a 10 \AA .

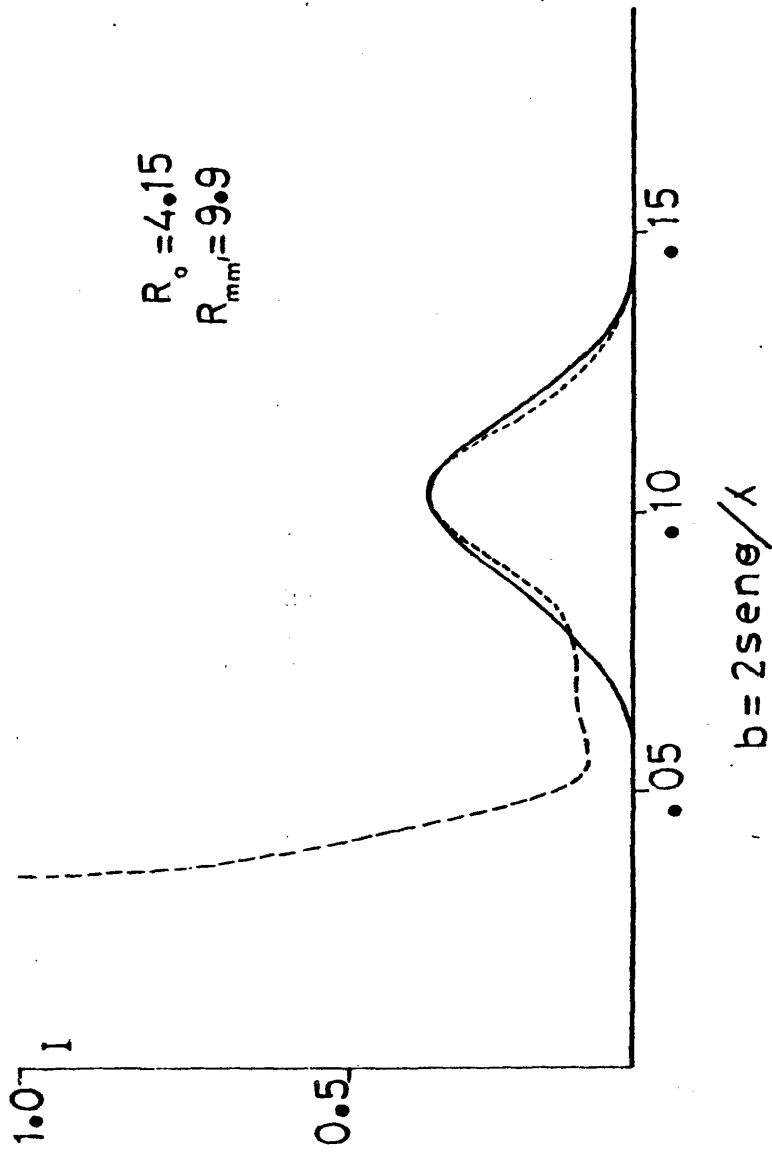


Fig. 10

3.3. Análisis en la dirección meridional

En los apilamientos de membranas, la difracción de Rayos-X es producida a causa de la periodicidad que se origina en la dirección de empaquetamiento, siendo la membrana el elemento unidad que se repite en esta dirección. Con membranas de superficie infinita o dimensiones laterales mucho mayores que su espesor, que no tuviesen ondulaciones, y estuviesen perfectamente ordenadas, estos paquetes podrían tratarse como cristales monodimensionales (37). En la práctica nos encontramos que las superficies de las membranas presentan ondulaciones y que la periodicidad fluctúa. Como consecuencia encontramos que el número de reflexiones que aparecen en la dirección meridional en el diagrama es pequeño, entre cuatro y seis, observándose también una rápida disminución de la intensidad y un ensanchamiento de los perfiles a medida que aumenta el espaciado.

En la Tabla VI están indicadas las posiciones, anchura integral e intensidad de las reflexiones registradas con MP orientada

TABLA VI

| planos reticulares | d (Å) | $\delta\beta_{\text{exp}}$ | $\delta\beta_{\text{corr}}$ | $I_{\text{rel}} \times b^2$ |
|-----------------------|----------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| (001) | 48.9±0.1 | 2.05±0.05 | 1.8±0.1 | 100.0 |
| (002) | 24.6±0.1 | 2.95±0.05 | 2.8±0.1 | 11.9 |
| (004) | 12.2±0.1 | 7.2 ±0.7 | 7.1±0.8 | 0.8 |
| (007) | 6.5±0.2 | | | |
| (0010) | 5.2±0.4 | | | |

Las reflexiones 007 y 0010 son muy débiles y aunque pueden posicionarse en registros hechos con más de 40 h de exposición las medidas de intensidad y anchura integral en estos picos vienen afectadas de un error muy grande pues el fondo debido a la radiación no coherente aumenta considerablemente con la exposición en esta dirección.

Cómo se ha visto en el Cap. 1 la transformada de Fourier inversa del perfil de intensidad, Fig. 11, es la función Q_{exp} . A partir de las relaciones dadas por Buerger (38) entre las posiciones y amplitudes de los picos de la función Q_{exp} y los de la función densidad electrónica se construye una función ρ_{mod} . El cuadrado de convolución de ρ_{mod} es la función Q_{mod} cuyos parámetros se refinan (39) hasta lograr el ajuste con la función Q_{exp} . La función ρ_{mod} que mejor ajusta Q_{exp} se considera el perfil de densidad electrónica solución.

3.3.1. Apilamiento imperfecto. Tamaño de los paquetes de MP

Trabajos recientes, realizados con diferentes membranas (40-42), muestran que los apilamientos presentan considerables distorsiones de red de tipo paracrystalino, debido a ondulaciones en las superficies de las membranas y a la naturaleza del empaquetamiento. El tratamiento considerando distorsiones de segunda especie en la red parece el más adecuado al estudiar estos sistemas.

En el caso de MP esta suposición viene apoyada por el hecho de que la representación $\delta\beta$ en función de b^2 , de acuerdo con la ecuación 1-34 es lineal (Fig. 12). A partir de la pendiente y la ordenada en el origen calculamos los parámetros que nos dan idea de las imperfecciones del empaquetamiento lamelar.

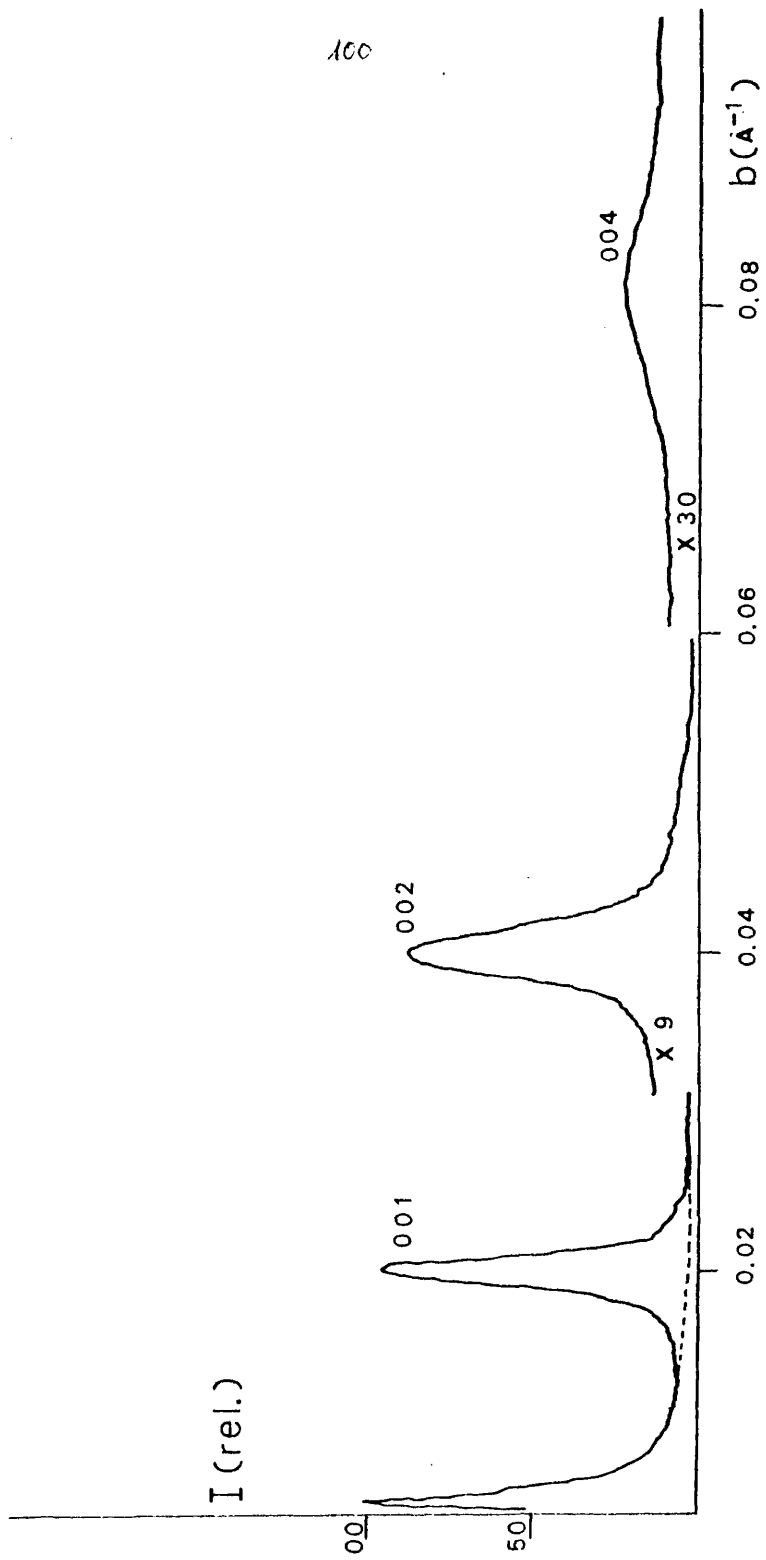


Fig. 11

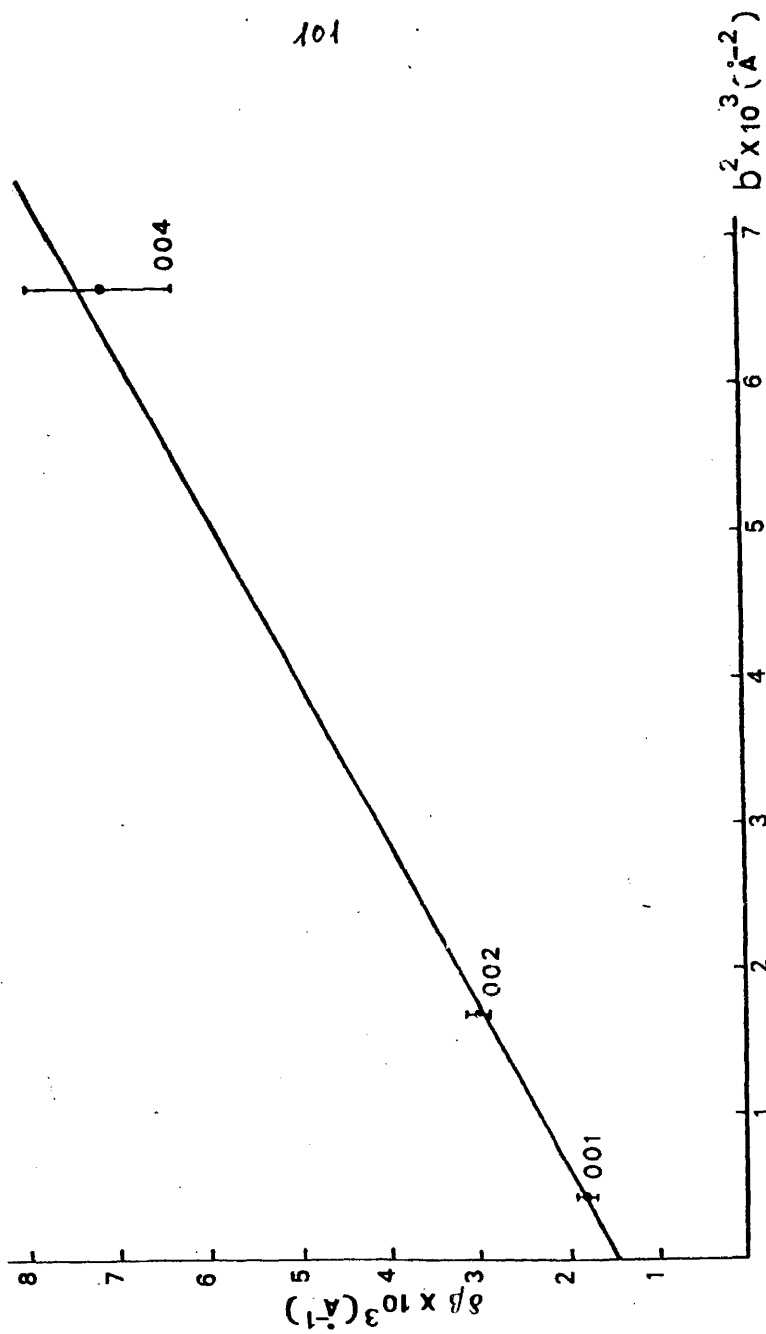


Fig. 12

La fluctuación paracrystalina promedio g así obtenida fué del $(4.5 \pm 0.7)\%$, el tamaño de los dominios que difractan coherentemente $D = 680 \pm 70 \text{ \AA}$ y el número de membranas promedio por paquete es $N = D/d = 14$.

En los cálculos siguientes consideraremos entonces que la proyección según el eje de empaquetamiento del espesor de las membranas muestra fluctuaciones, caracterizadas por una distribución de probabilidad H_1 , mientras que la distancia entre membranas adyacentes muestra una distribución de probabilidad caracterizada por la función H_2 . Las distribuciones H_1 y H_2 , ambas de tipo gaussiano no están correlacionadas.

3.3.2. Cálculo de la función Q y del perfil de densidad electrónica

La función Q experimental se obtiene como la transformada de Fourier inversa de la intensidad difractada (Fig. 11) de acuerdo con la ecuación

$$Q_{\text{exp}}(x) = 2 \int_0^{b_{\text{máx}}} (I(b)_c) \cos(2\pi b x) db \quad |12|$$

donde $I(b)_c$ representa la función intensidad cooregida y b es el vector en el espacio recíproco.

En los experimentos a ángulos bajos, usando colimadores puntuales, las correcciones que se hacen a la intensidad experimental difractada por empaquetamientos lamelares son las debidas al factor de Lorentz, cuyo valor en este caso es $1/b^2$ de acuerdo con Neff (43) y Azároff (44) por lo tanto,

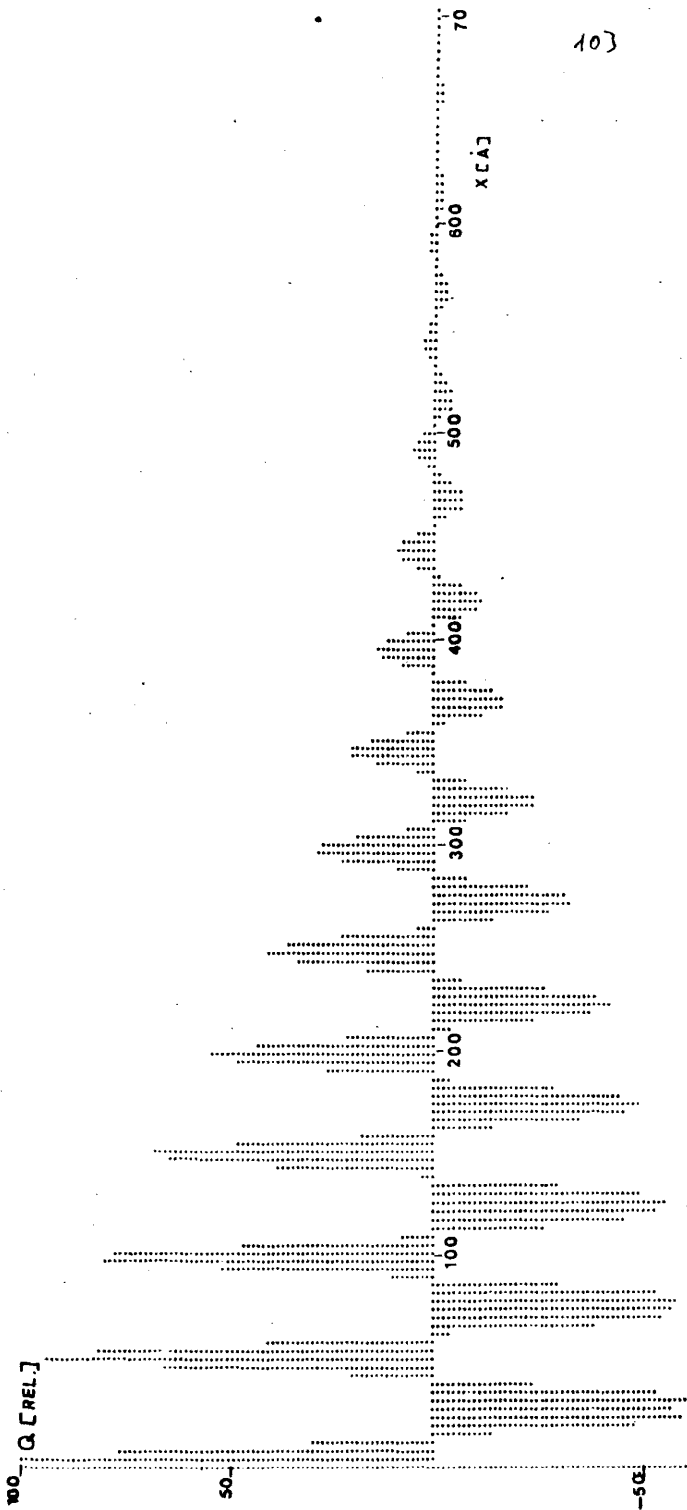


Fig. 13

$$I(b)_{\text{corr}} = I(b)_{\text{exp}} b^2 \quad |13|$$

La función Q_{exp} así obtenida que puede verse en la Fig. 13 es casi periódica y decrece lentamente al aumentar la distancia desde el origen, anulándose después de 14 períodos, en buen acuerdo con el tamaño del dominio cristalino obtenido de la representación $\delta\beta$ frente a b^2 incluida en el apartado anterior.

Según de vió en el Cap. 1, representando la densidad electrónica de una membrana cómo la suma de gaussianas $G(A_i, x_i, c)$ de amplitudes A_i , en las posiciones x_i y de la misma anchura c , la Q modelo teniendo en cuenta las distorsiones de la red, viene dada por la expresión 1-|42|.

En el caso de MP es suficiente usar solamente los cuatro primeros términos de la ecuación anterior para describir la función Q_{exp} en el intervalo $x=0$ hasta $x=L=49 \text{ \AA}$.

La función Q modelo viene dada entonces por la expresión

$$Q_{\text{mod}}(x) = 2N Q_m(x) * \delta(x-0) + N Q_{m_1} * H_2 + (N-1) Q_{m_2} * H_1 + \\ + 2(N-1) Q_m * H_1 * H_2 \quad |14|$$

Los valores de Q_{exp} se tomaron a intervalos de 1 \AA , siendo este el intervalo de cálculo en Q_{mod} . El mejor conjunto de parámetros obtenidos para la membrana púrpura se muestra en la Tabla VI. El número de funciones gaussianas empleadas en la construcción del modelo fueron cuatro. En las dos primeras columnas de la Tabla VIII puede verse el listado de los valores de Q_{exp} y Q_{mod} calculada con este conjunto de parámetros. La contribución de las distorsiones al

| PARAMETERS | PREN | DIFF | U.0 | U.1 | U.2 | U.3 | U.4 | U.5 | U.6 | U.7 | U.8 | U.9 | U.10 | U.11 | U.12 | U.13 | U.14 | U.15 | U.16 | U.17 | U.18 | U.19 | U.20 | U.21 | U.22 | U.23 | U.24 | U.25 | U.26 | U.27 | U.28 | U.29 | U.30 | U.31 | U.32 | U.33 | U.34 | U.35 | U.36 | U.37 | U.38 | U.39 | U.40 | U.41 | U.42 | U.43 | U.44 | U.45 | U.46 | U.47 | U.48 | U.49 | U.50 | U.51 | U.52 | U.53 | U.54 | U.55 | U.56 | U.57 | U.58 | U.59 | U.60 | U.61 | U.62 | U.63 | U.64 | U.65 | U.66 | U.67 | U.68 | U.69 | U.70 | U.71 | U.72 | U.73 | U.74 | U.75 | U.76 | U.77 | U.78 | U.79 | U.80 | U.81 | U.82 | U.83 | U.84 | U.85 | U.86 | U.87 | U.88 | U.89 | U.90 | U.91 | U.92 | U.93 | U.94 | U.95 | U.96 | U.97 | U.98 | U.99 | U.100 | U.101 | U.102 | U.103 | U.104 | U.105 | U.106 | U.107 | U.108 | U.109 | U.110 | U.111 | U.112 | U.113 | U.114 | U.115 | U.116 | U.117 | U.118 | U.119 | U.120 | U.121 | U.122 | U.123 | U.124 | U.125 | U.126 | U.127 | U.128 | U.129 | U.130 | U.131 | U.132 | U.133 | U.134 | U.135 | U.136 | U.137 | U.138 | U.139 | U.140 | U.141 | U.142 | U.143 | U.144 | U.145 | U.146 | U.147 | U.148 | U.149 | U.150 | U.151 | U.152 | U.153 | U.154 | U.155 | U.156 | U.157 | U.158 | U.159 | U.160 | U.161 | U.162 | U.163 | U.164 | U.165 | U.166 | U.167 | U.168 | U.169 | U.170 | U.171 | U.172 | U.173 | U.174 | U.175 | U.176 | U.177 | U.178 | U.179 | U.180 | U.181 | U.182 | U.183 | U.184 | U.185 | U.186 | U.187 | U.188 | U.189 | U.190 | U.191 | U.192 | U.193 | U.194 | U.195 | U.196 | U.197 | U.198 | U.199 | U.200 | U.201 | U.202 | U.203 | U.204 | U.205 | U.206 | U.207 | U.208 | U.209 | U.210 | U.211 | U.212 | U.213 | U.214 | U.215 | U.216 | U.217 | U.218 | U.219 | U.220 | U.221 | U.222 | U.223 | U.224 | U.225 | U.226 | U.227 | U.228 | U.229 | U.230 | U.231 | U.232 | U.233 | U.234 | U.235 | U.236 | U.237 | U.238 | U.239 | U.240 | U.241 | U.242 | U.243 | U.244 | U.245 | U.246 | U.247 | U.248 | U.249 | U.250 | U.251 | U.252 | U.253 | U.254 | U.255 | U.256 | U.257 | U.258 | U.259 | U.260 | U.261 | U.262 | U.263 | U.264 | U.265 | U.266 | U.267 | U.268 | U.269 | U.270 | U.271 | U.272 | U.273 | U.274 | U.275 | U.276 | U.277 | U.278 | U.279 | U.280 | U.281 | U.282 | U.283 | U.284 | U.285 | U.286 | U.287 | U.288 | U.289 | U.290 | U.291 | U.292 | U.293 | U.294 | U.295 | U.296 | U.297 | U.298 | U.299 | U.300 | U.301 | U.302 | U.303 | U.304 | U.305 | U.306 | U.307 | U.308 | U.309 | U.310 | U.311 | U.312 | U.313 | U.314 | U.315 | U.316 | U.317 | U.318 | U.319 | U.320 | U.321 | U.322 | U.323 | U.324 | U.325 | U.326 | U.327 | U.328 | U.329 | U.330 | U.331 | U.332 | U.333 | U.334 | U.335 | U.336 | U.337 | U.338 | U.339 | U.340 | U.341 | U.342 | U.343 | U.344 | U.345 | U.346 | U.347 | U.348 | U.349 | U.350 | U.351 | U.352 | U.353 | U.354 | U.355 | U.356 | U.357 | U.358 | U.359 | U.360 | U.361 | U.362 | U.363 | U.364 | U.365 | U.366 | U.367 | U.368 | U.369 | U.370 | U.371 | U.372 | U.373 | U.374 | U.375 | U.376 | U.377 | U.378 | U.379 | U.380 | U.381 | U.382 | U.383 | U.384 | U.385 | U.386 | U.387 | U.388 | U.389 | U.390 | U.391 | U.392 | U.393 | U.394 | U.395 | U.396 | U.397 | U.398 | U.399 | U.400 | U.401 | U.402 | U.403 | U.404 | U.405 | U.406 | U.407 | U.408 | U.409 | U.410 | U.411 | U.412 | U.413 | U.414 | U.415 | U.416 | U.417 | U.418 | U.419 | U.420 | U.421 | U.422 | U.423 | U.424 | U.425 | U.426 | U.427 | U.428 | U.429 | U.430 | U.431 | U.432 | U.433 | U.434 | U.435 | U.436 | U.437 | U.438 | U.439 | U.440 | U.441 | U.442 | U.443 | U.444 | U.445 | U.446 | U.447 | U.448 | U.449 | U.450 | U.451 | U.452 | U.453 | U.454 | U.455 | U.456 | U.457 | U.458 | U.459 | U.460 | U.461 | U.462 | U.463 | U.464 | U.465 | U.466 | U.467 | U.468 | U.469 | U.470 | U.471 | U.472 | U.473 | U.474 | U.475 | U.476 | U.477 | U.478 | U.479 | U.480 | U.481 | U.482 | U.483 | U.484 | U.485 | U.486 | U.487 | U.488 | U.489 | U.490 | U.491 | U.492 | U.493 | U.494 | U.495 | U.496 | U.497 | U.498 | U.499 | U.500 | U.501 | U.502 | U.503 | U.504 | U.505 | U.506 | U.507 | U.508 | U.509 | U.510 | U.511 | U.512 | U.513 | U.514 | U.515 | U.516 | U.517 | U.518 | U.519 | U.520 | U.521 | U.522 | U.523 | U.524 | U.525 | U.526 | U.527 | U.528 | U.529 | U.530 | U.531 | U.532 | U.533 | U.534 | U.535 | U.536 | U.537 | U.538 | U.539 | U.540 | U.541 | U.542 | U.543 | U.544 | U.545 | U.546 | U.547 | U.548 | U.549 | U.550 | U.551 | U.552 | U.553 | U.554 | U.555 | U.556 | U.557 | U.558 | U.559 | U.560 | U.561 | U.562 | U.563 | U.564 | U.565 | U.566 | U.567 | U.568 | U.569 | U.570 | U.571 | U.572 | U.573 | U.574 | U.575 | U.576 | U.577 | U.578 | U.579 | U.580 | U.581 | U.582 | U.583 | U.584 | U.585 | U.586 | U.587 | U.588 | U.589 | U.590 | U.591 | U.592 | U.593 | U.594 | U.595 | U.596 | U.597 | U.598 | U.599 | U.600 | U.601 | U.602 | U.603 | U.604 | U.605 | U.606 | U.607 | U.608 | U.609 | U.610 | U.611 | U.612 | U.613 | U.614 | U.615 | U.616 | U.617 | U.618 | U.619 | U.620 | U.621 | U.622 | U.623 | U.624 | U.625 | U.626 | U.627 | U.628 | U.629 | U.630 | U.631 | U.632 | U.633 | U.634 | U.635 | U.636 | U.637 | U.638 | U.639 | U.640 | U.641 | U.642 | U.643 | U.644 | U.645 | U.646 | U.647 | U.648 | U.649 | U.650 | U.651 | U.652 | U.653 | U.654 | U.655 | U.656 | U.657 | U.658 | U.659 | U.660 | U.661 | U.662 | U.663 | U.664 | U.665 | U.666 | U.667 | U.668 | U.669 | U.670 | U.671 | U.672 | U.673 | U.674 | U.675 | U.676 | U.677 | U.678 | U.679 | U.680 | U.681 | U.682 | U.683 | U.684 | U.685 | U.686 | U.687 | U.688 | U.689 | U.690 | U.691 | U.692 | U.693 | U.694 | U.695 | U.696 | U.697 | U.698 | U.699 | U.700 | U.701 | U.702 | U.703 | U.704 | U.705 | U.706 | U.707 | U.708 | U.709 | U.710 | U.711 | U.712 | U.713 | U.714 | U.715 | U.716 | U.717 | U.718 | U.719 | U.720 | U.721 | U.722 | U.723 | U.724 | U.725 | U.726 | U.727 | U.728 | U.729 | U.730 | U.731 | U.732 | U.733 | U.734 | U.735 | U.736 | U.737 | U.738 | U.739 | U.740 | U.741 | U.742 | U.743 | U.744 | U.745 | U.746 | U.747 | U.748 | U.749 | U.750 | U.751 | U.752 | U.753 | U.754 | U.755 | U.756 | U.757 | U.758 | U.759 | U.760 | U.761 | U.762 | U.763 | U.764 | U.765 | U.766 | U.767 | U.768 | U.769 | U.770 | U.771 | U.772 | U.773 | U.774 | U.775 | U.776 | U.777 | U.778 | U.779 | U.780 | U.781 | U.782 | U.783 | U.784 | U.785 | U.786 | U.787 | U.788 | U.789 | U.790 | U.791 | U.792 | U.793 | U.794 | U.795 | U.796 | U.797 | U.798 | U.799 | U.800 | U.801 | U.802 | U.803 | U.804 | U.805 | U.806 | U.807 | U.808 | U.809 | U.810 | U.811 | U.812 | U.813 | U.814 | U.815 | U.816 | U.817 | U.818 | U.819 | U.820 | U.821 | U.822 | U.823 | U.824 | U.825 | U.826 | U.827 | U.828 | U.829 | U.830 | U.831 | U.832 | U.833 | U.834 | U.835 | U.836 | U.837 | U.838 | U.839 | U.840 | U.841 | U.842 | U.843 | U.844 | U.845 | U.846 | U.847 | U.848 | U.849 | U.850 | U.851 | U.852 | U.853 | U.854 | U.855 | U.856 | U.857 | U.858 | U.859 | U.860 | U.861 | U.862 | U.863 | U.864 | U.865 | U.866 | U.867 | U.868 | U.869 | U.870 | U.871 | U.872 | U.873 | U.874 | U.875 | U.876 | U.877 | U.878 | U.879 | U.880 | U.881 | U.882 | U.883 | U.884 | U.885 | U.886 | U.887 | U.888 | U.889 | U.890 | U.891 | U.892 | U.893 | U.894 | U.895 | U.896 | U.897 | U.898 | U.899 | U.900 | U.901 | U.902 | U.903 | U.904 | U.905 | U.906 | U.907 | U.908 | U.909 | U.910 | U.911 | U.912 | U.913 | U.914 | U.915 | U.916 | U.917 | U.918 | U.919 | U.920 | U.921 | U.922 | U.923 | U.924 | U.925 | U.926 | U.927 | U.928 | U.929 | U.930 | U.931 | U.932 | U.933 | U.934 | U.935 | U.936 | U.937 | U.938 | U.939 | U.940 | U.941 | U.942 | U.943 | U.944 | U.945 | U.946 | U.947 | U.948 | U.949 | U.950 | U.951 | U.952 | U.953 | U.954 | U.955 | U.956 | U.957 | U.958 | U.959 | U.960 | U.961 | U.962 | U.963 | U.964 | U.965 | U.966 | U.967 | U.968 | U.969 | U.970 | U.971 | U.972 | U.973 | U.974 | U.975 | U.976 | U.977 | U.978 | U.979 | U.980 | U.981 | U.982 | U.983 | U.984 | U.985 | U.986 | U.987 | U.988 | U.989 | U.990 | U.991 | U.992 | U.993 | U.994 | U.995 | U.996 | U.997 | U.998 | U.999 | U.1000 | U.1001 | U.1002 | U.1003 | U.1004 | U.1005 | U.1006 | U.1007 | U.1008 | U.1009 | U.1010 | U.1011 | U.1012 | U.1013 | U.1014 | U.1015 | U.1016 | U.1017 | U.1018 | U.1019 | U.1020 | U.1021 | U.1022 | U.1023 | U.1024 | U.1025 | U.1026 | U.1027 | U.1028 | U.1029 | U.1030 | U.1031 | U.1032 | U.1033 | U.1034 | U.1035 | U.1036 | U.1037 | U.1038 | U.1039 | U.1040 | U.1041 | U.1042 | U.1043 | U.1044 | U.1045 | U.1046 | U.1047 | U.1048 | U.1049 | U.1050 | U.1051 | U.1052 | U.1053 | U.1054 | U.1055 | U.1056 | U.1057 | U.1058 | U.1059 | U.1060 | U.1061 | U.1062 | U.1063 | U.1064 | U.1065 | U.1066 | U.1067 | U.1068 | U.1069 | U.1070 | U.1071 | U.1072 | U.1073 | U.1074 | U.1075 | U.1076 | U.1077 | U.1078 | U.1079 | U.1080 | U.1081 | U.1082 | U.1083 | U.1084 | U.1085 | U.1086 | U.1087 | U.1088 | U.1089 | U.1090 | U.1091 | U.1092 | U.1093 | U.1094 | U.1095 | U.1096 | U.1097 | U.1098 | U.1099 | U.1100 | U.1101 | U.1102 | U.1103 | U.1104 | U.1105 | U.1106 | U.1107 | U.1108 | U.1109 | U.1110 | U.1111 | U.1112 | U.1113 | U.1114 | U.1115 | U.1116 | U.1117 | U.1118 | U.1119 | U.1120 | U.1121 | U.1122 | U.1123 | U.1124 | U.1125 | U.1126 | U.1127 | U.1128 | U.1129 | U.1130 | U.1131 | U.1132 | U.1133 | U.1134 | U.1135 | U.1136 | U.1137 | U.1138 | U.1139 | U.1140 | U.1141 | U.1142 | U.1143 | U.1144 | U.1145 | U.1146 | U.1147 | U.1148 | U.1149 | U.1150 | U.1151 | U.1152 | U.1153 | U.1154 | U.1155 | U.1156 | U.1157 | U.1158 | U.1159 | U.1160 | U.1161 | U.1162 | U.1163 | U.1164 | U.1165 | U.1166 | U.1167 | U.1168 | U.1169 | U.1170 | U.1171 | U.1172 | U.1173 | U.1174 | U.1175 | U.1176 | U.1177 | U.1178 | U.1179 | U.1180 | U.1181 | U.1182 | U.1183 | U.1184 | U.1185 | U.1186 | U.1187 | U.1188 | U.1189 | U.1190 | U.1191 | U.1192 | U.1193 | U.1194 | U.1195 | U.1196 | U.1197 | U.1198 |
|------------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|------------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|

perfil de la función Q_{exp} puede separarse reemplazando las función de distribución H_1 y H_2 por funciones δ . El perfil de densidad electrónica de la membrana sin distorsionar y su cuadrado de convolución la función Q_0 (Fig. 14) se obtienen entonces cómo suma de las funciones gaussianas de amplitudes A_k , posicionadas en x_k y de anchura c dados en la Tabla II.

La función ρ_0 , densidad electrónica de la celdilla unida puede expresarse también cómo una serie de cosenos en el intervalo $[-L/2, L/2]$, siendo L la periodicidad observada, de acuerdo con la ecuación

$$\rho_0(x) = a_0 + \sum_{k=1}^N a_k \cos \frac{2\pi kx}{L} \quad |15| \quad -L/2 \leq x \leq L/2$$

El cálculo de $\rho_0(x)$ en esta representación se puede hacer si se conocen los valores de los coeficientes y sus signos, la lista de los cuales se adjunta en la Tabla IX para el caso de la solución obtenida anteriormente como suma de gaussianas. La asignación de pares a las reflexiones observadas es entonces prácticamente inmediata, siendo la secuencia en este caso (+++-).

TABLA VII

| A_i | x_i | c_i | ℓ_i, R_q | Δ_i, g |
|-------|-------|--------------|----------------|--------------------------------|
| -0.15 | 0.00 | $c=0.0178$ | $\ell_1=30.94$ | $\Delta_1=3.33$ |
| -2.08 | 6.22 | $c_1=0.045$ | $\ell_2=17.57$ | $\Delta =0.07$ |
| +1.06 | 21.18 | $c_2=100.00$ | $R_q=0.002$ | $\Delta=\Delta_1+\Delta_2=3.4$ |
| +1.68 | 32.69 | | $G_q=0.007$ | $g=6.9\%$ |

107

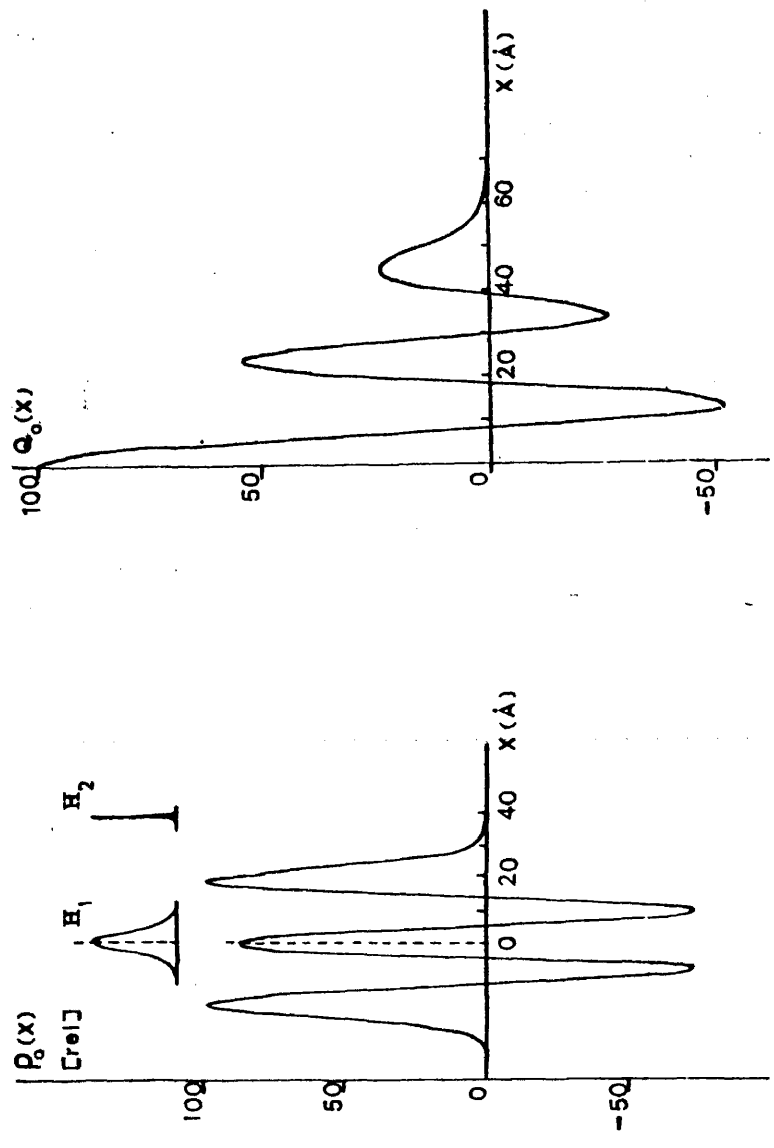


Fig. 14

TABLA IX

Coeficientes a_k en el desarrollo de $\rho_0(x)$ en serie de cosenos

| <u>k</u> | <u>a_k</u> | <u>k</u> | <u>a_k</u> |
|----------|-------------------------|----------|-------------------------|
| 0 | +0.389 | 9 | +1.145 |
| 1 | +0.603 | 10 | +1.030 |
| 2 | +0.173 | 11 | +0.732 |
| 3 | -0.273 | 12 | -0.381 |
| 4 | -0.492 | 13 | +0.085 |
| 5 | -0.362 | 14 | -0.100 |
| 6 | +0.059 | 15 | -0.179 |
| 7 | +0.581 | 16 | -0.170 |
| 8 | +0.990 | | |

El principal problema que plantea este método de desconvolución es el de la unicidad de la solución obtenida. El problema que se plantea en cristalografía de la elección del conjunto de fases apropiado se manifiesta en este caso en la existencia de varios conjuntos de parámetros que dan grados semejantes de aproximación. En la Tabla X viene dado otro conjunto de parámetros que siendo totalmente diferente a los de la anterior solución proporciona una aproximación aceptable a la función Q_{exp} como puede observarse en la Tabla XI. Las funciones $\rho_0(x)$ y $Q_0(x)$ calculadas en este caso son las que se encuentran en la Fig. 15. La secuencia de fases correspondiente a este caso es (+---).

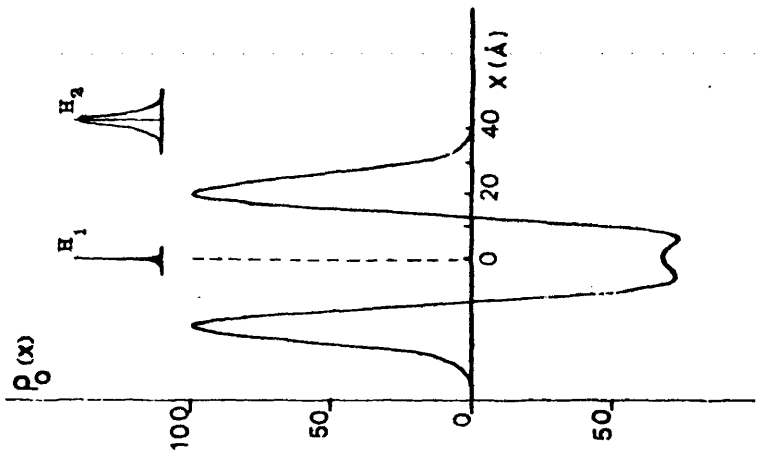
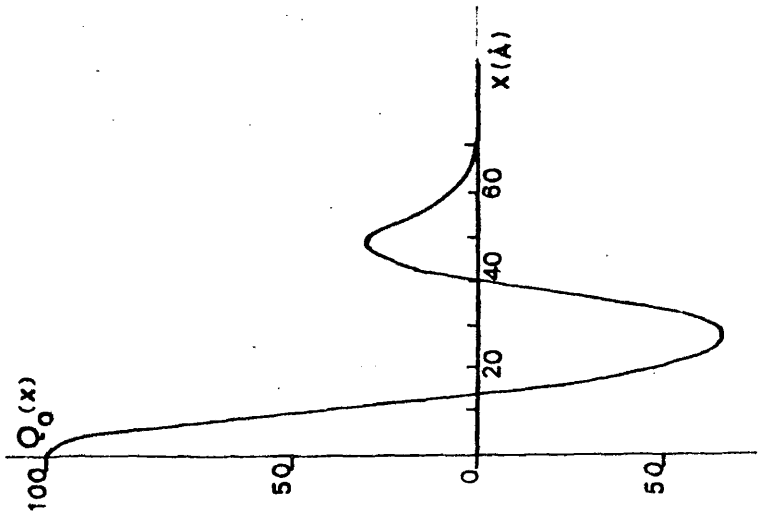


Fig. 15

TABLA X

| A_i | x_i | c_i | ℓ_i, R_q | Δ_i, g |
|-------|-------|--------------|----------------|--------------------------------|
| -1.67 | 0.00 | $c=0.0173$ | $\ell_1=36.12$ | $\Delta_1=0.05$ |
| 1.63 | 2.89 | $c_1=190.28$ | $\ell_2=12.67$ | $\Delta_2=5.05$ |
| 1.18 | 23.43 | $c_2=0.0196$ | $R_q=0.005$ | $\Delta=\Delta_1+\Delta_2=5.1$ |
| -1.42 | 41.12 | | $G_q=0.010$ | $g=10.5\%$ |

La elección de la solución se hace por tanto no sólo en base a criterios de mejor ajuste, menor R_q , sino también teniendo en cuenta cual de las soluciones nos proporciona un valor para la fluctuación paracristalina g acorde con el obtenido independientemente partir de la representación $\delta\beta$ frente a b^2 .

BIBLIOGRAFIA

1. Blaurock, A.E., J. Mol. Biol., 93, 139 (1975)
2. Blaurock, A.E., Stoeckenius, W., Nature New Biol., 233, 152 (1971)
3. Henderson, R., Shutton, D., J. Mol. Biol., 139, 99 (1980)
4. Stoeckenius, W., Sci. Am., 234, 38 (1976)
5. Cullity, B.D., Elements of X-ray diffraction, Addison-Wesley (1956)
6. International Tables of X-ray Crystallography, Vol. II, Kynoch-Press, Birmingham. England (1972)
7. Klug, H.P., Alexander, L.E., X-ray diffraction Procedures for Polycrystalline and Amorphous Materials, John Wiley, New York (1974), 2ª edición.
8. Stoeckenius, W., Kunan, W.H., J. Cell Biol., 38, 377 (1968)
9. Stoeckenius, W., Lozier, R.H., Bogomolni, R.A., Biochem. Biophys. Acta, 505, 215 (1979)
10. Henderson, R., J. Mol. Biol., 93, 123 (1975)
11. Hosemann, R., Bagchi, S.N., "Direct Analysis of Diffraction by Matter", North Holland. Amsterdam (1962)
12. Hosemann, R., Physikalische Blätter, 34(11), 511 (1978)
13. Hosemann, R., Wilke, W., Makromol. Chem., 118, 230 (1968)
14. Fraser, R.D.B., Mac Rae, T.P., Conformation in Fibrous Proteins. Academic Press, New York (1973)
15. Mac Gillavry, C.H., Bruins, E.H., Acta Cryst., 1, 156 (1948)
16. Heyn, A.N.J., J. Appl. Phys., 5, 519 (1955)
17. Burger, R.E., J. Mol. Biol., 7, 213 (1963)
18. Schmidt, P.W., J. Appl. Cryst., 3, 257 (1970)
19. Harget, P.J., Krimm, S., Acta Cryst., A27, 586 (1971)
20. Pringle, O.A., Schmidt, P.W., J. Appl. Cryst., 4, 290 (1971)
21. Puigjaner, L.C., Subirana, J.A., J. Appl. Cryst., 7, 169 (1974)
22. Green, J.P., Phillips, M.C., Shipley, G.G., Biochem. Biophys. Acta, 110, 243 (1973)

23. Ishimuro, Y., Hamada, F., Nakajima, A., *Macromolecules*, 2, 382 (1978)
24. Fraser, R.D.B., Mac Rae, T.P., Roger, G.E., "keratins Their Composition, Structure and Biosynthesis", Thomas, Springfield Ed. Illinois, U.S.A.
25. Cohen, C., Holmes, K.C., *J. Mol. Biol.*, 6, 423 (1963)
26. Unwin, P.N.T., Henderson, R., *J. Mol. Biol.*, 94, 425 (1975)
27. Burge, R.E., *Proc. Roy. Sco. Ser.*, A260, 558 (1961)
28. Vainshtein, B.K., "Diffraction of X-Rays by Chain Molecules", Elsevier, London (1966)
29. Oster, G., Riley, D.P., *Acta Cryst.*, 5, 272 (1952)
30. Henderson, R., Unwin, P.N.T., *Nature*, 257, 28 (1975)
31. Engelmann, D.H., Henderson, R., McLachan, A.D, Wallace, B.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 4, 2023 (1980)
32. Mac Arthur, I., *Nature*, 152, 38 (1943)
33. Perutz, M.F., *Nature*, 167, 1053 (1951)
34. Pauling, L., Corey, R.B., *Nature*, 171, 59 (1953)
35. Crick, F.H.C., *Nature*, 70, 882 (1952)
36. Crick, F.H.C., *Acta Cryst.* 6, 600 (1953)
37. Kreutz, W., Pape, E.H., "Biological Membranes", Edit. Konrad, Colbow, Canada (1975)
38. Buerger, H.J., "Vector Space and its application in crystal-structure investigation", Ed. John Wiley and Sons (1959)
39. Marquart, D.W., *Indust. Math.*, 11, 431 (1961)
40. Hybl, A., *J. Appl. Cryst.*, 10, 141 (1977)
41. Blaurock, A.E., Nelander, J.C., *J. Mol. Biol.*, 103, 421 (1976)
42. Gbordzoe, M.K. Kreutz, W., *A. Naturforsch.*, 33c, 184 (1978)
43. Neff, H., "Grundlagen und Anwendungen der Röntgen-Strukturanalyse", Oldenboury Verlag, München (1962)
44. Azároff, L.V., "Elements of X-Ray Crystallography", Mc Graw Hill Book Co., New York (1968)

114

4. DISCUSSION

4.1. Discusión de los parámetros de celdilla calculados

El conjunto de parámetros de celdilla calculados no presenta diferencias importantes de los dados por otros investigadores (1,2,3). El espaciado en el que aparece la primera reflexión meridional, correspondiente a la periodicidad de empaquetamiento de las membranas, nos da la longitud de la celdilla en esta dirección. Este espaciado depende de las condiciones de preparación de la muestra, fundamentalmente de la cantidad de agua entre membranas. Henderson (2) da espaciados entre 47.8 \AA y 53.0 \AA . En nuestro caso el valor obtenido 48.9 \AA es el límite inferior de los valores calculados. Hinchando la MP en atmósferas con distintos grados de humedad obtuvimos valores de 52.3 \AA (25h de hinchamiento en atmósfera al 44% de humedad relativa controlada mediante CO_2 anhidro), y 53.5 \AA (25h de hinchamiento en atmósfera al 100% de humedad relativa).

Debido a que el número de reflexiones que aparece en esta dirección meridional es pequeño, tres, intentamos conseguir una mejor orientación de las membranas con objeto de obtener más reflexiones y mejorar así la resolución del perfil de densidad electrónica. Aunque se pudieron posicionar otras reflexiones (ver 3.1) las medidas de intensidad y anchura integral no fueron posibles debido a su débil intensidad. Blaurock que en un trabajo inicial (3) mencionaba la existencia de seis reflexiones en esta dirección, posteriormente comenta la imposibilidad de hacer medidas de intensidad en más de tres de ellas (4).

La banda centrada a $(5.0 \pm 0.1) \text{ \AA}$ en esta dirección es característica de la existencia de α -hélices en la proteína de membrana. Desde los trabajos de Crick (5), Pauling y Corey (6) se inter -

preta cómo distancia promedio correspondiente al paso de hélice. En la dirección ecuatorial sorprende el número de picos observados. En la mayoría de las membranas biológicas y membranas modelo estudiada hasta el momento, la disposición topológica de las moléculas de lípido y proteína es poco conocida debido a la ausencia de difracción en esta dirección, consecuencia de la disposición desordenada de las moléculas de proteína en la bicapa lipídica. Común a otras membranas sólo son los halos que aparecen en esta dirección a 10.0 \AA y 4.6 \AA . El valor de $(61.5 \pm 0.1) \text{ \AA}$ (dimensión de la celdilla en el plano de la membrana) coincide prácticamente con el obtenido por Blaur $(61.4 \pm 0.3) \text{ \AA}$. Las posiciones de las reflexiones se ajustan perfectamente con una celdilla hexagonal ($a=b=61.5$). Hemos registrado cuatro nuevas reflexiones de índices 540, 800, 720 y 640 que aparecen a espaciados (6.81 ± 0.05) , (6.65 ± 0.05) , (6.51 ± 0.05) y (6.05 ± 0.05) dados en \AA .

La estructura hexagonal sucede no sólo en la superficie de la membrana, sino que se mantiene a lo largo de la sección transversal de la misma cómo lo prueba el hecho de que estos picos aparecen tanto si el haz de Rayos-X incide perpendicularmente cómo si lo hace paralelamente al plano de la membrana, en el primer caso aparecen anillos a estos espaciados (microcristales dispuestos al azar en el segundo se observan arcos (orientación parcial en la dirección de empaquetamiento). En ninguno de los numerosos estudios realizados con bicapas lipídicas (8,9), lípidos extraídos de membranas (3,10) aparecen reflexiones en esta dirección, por lo que parece incuestionable asociar su presencia con la distribución regular de la única proteína que existe en la membrana púrpura, la BR.

El halo en la dirección ecuatorial centrado a 10 \AA aparece en muchos diagramas de difracción de membranas y es característico de proteínas con segmentos de cadena helicoidales del tipo α o β . Esta banda se asocia a la distancia promedio entre hélices. Membranas como la del eritrocito donde la mayoría de las proteínas están ligadas superficialmente no presentan esta banda de difracción. Esta contribución ecuatorial parece que ocurre solamente en membranas en las que hay proteínas con segmentos helicoidales que atraviesan la membrana.

La otra banda de difracción que aparece en la dirección ecuatorial está centrada en 4.6 \AA . Este espaciado típico de las parafinas líquidas y líquidos hidrocarbonados, aparece en todos los diagramas de difracción de bicapas lipídicas y membranas. Corresponde a la distancia promedio entre cadenas hidrocarbonadas de los lípidos. La anchura y extensión a zonas por encima y debajo de la dirección ecuatorial indica que las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos no son totalmente paralelas, y están bastante desordenadas aunque muestran orientación preferente en ángulo recto al plano de la membrana. La intensidad de esta banda unida al hecho de que los lípidos constituyen sólo el 25% de la masa de la MP, sugiere que la mayoría de las moléculas de lípido deben estar en contacto unas con otras y agrupadas en zonas discretas de la MP.

4.2. NATURALEZA PARACRISTALINA DE LA MEMBRANA PURPURA

4.2.1. Distorsiones en el plano de la membrana

El estudio de la paracristalinidad de la Membrana Púrpura orientada nos proporciona información referente al tamaño de los dominios que difractan coherentemente y se sitúan en el plano de la membrana y al mismo tiempo también nos suministra datos cuantitativos relacionados con el tipo y grado de desorden existente en la red de proteína que hay en la membrana.

Lo primero que se plantea entonces es establecer si el desorden presente en el interior de la membrana es el resultado de distorsiones estructurales que mantienen el orden de largo alcance en los microcristales (microtensiones o distorsiones de primera especie) ó de distorsiones en las que no se mantiene el orden de largo alcance (distorsiones de segunda especie). Este último tipo de desorden conocido como paracristalinidad, ha sido discutido por Hosemann (11) y se ha demostrado que existe no sólo en polímeros sintéticos (12), ferritas (13), metales fundidos (14), sino también en biopolímeros (15) y membranas biológicas (16).

El distinguir entre los dos tipos de distorsiones a partir del ensanchamiento de los perfiles que aparecen en los diagramas de difracción de Rayos-X requiere al analizar al menos tres órdenes en una dirección dada por los índices hkl . De acuerdo con Hosemann (17) la distinción entre distorsiones de segunda especie (paracristales) puede hacerse mediante la representación $\delta\beta_{hkl}$ frente a b y $\delta\beta_{hkl}$ frente a b^2 (ver 1.2.1). Si la representación $\delta\beta_{hkl}$ frente a b es lineal entonces estamos en el caso de distorsiones de

primera especie, si por el contrario esto no sucede cómo en el caso de Membrana Púrpura (Cap. 3, fig. 4) y además la representación $\delta\beta_{hkl}$ frente a b^2 es lineal (ver 1.2.1) se admite que la estructura es paracristalina. Esta linealidad es clara en el caso de los siete órdenes que aparecen en la familia de planos reticulares (100) (Cap. 3, fig. 4). La aparente desviación de la reflexión 700 de la linealidad puede explicarse debido a la contribución de la reflexión 530 que aparece al mismo espaciado, ya que h^2+hk+k^2 tiene el mismo valor en ambos casos. La representación $\delta\beta$ frente a b , muestra por otra parte (Cap. 3, fig. 5) un aumento parabólico, lo que sugiere que las contribuciones de defectos de primera especie es despreciable.

Para las direcciones $[110]$, $[210]$ y $[310]$ los valores obtenidos se ven afectados de mayor error al ser menor el número de reflexiones que aparecen en estas direcciones (Cap. 3, tabla II). El conjunto de reflexiones investigadas muestra indicios de existencia de anisotropía en D (tamaño del microcristal) aunque ésta no parece muy acusada. El menor valor de D se obtiene en la dirección de empaquetamiento más denso de la distribución de proteínas, con una fluctuación entre planos $g_{100}=1.5\%$ que suponemos asociada a irregularidades en el empaquetamiento de la proteína BR. Este valor es del mismo orden de magnitud que las fluctuaciones encontradas en polímeros sintéticos (18). Los valores g_{210} y g_{310} son ligeramente mayores debido a que la distancia entre los planos respectivos son menores que las correspondientes a los empaquetamientos en la dirección $[100]$. El valor de g_{100} puede deducirse también a partir de las medidas independientes de g_{210} y g_{310} . Teniendo en cuenta que $d_{100}/d_{210}=2.65$ y $d_{100}/d_{310}=3.6$ la ecuación que obtenemos viene

dada por $g_{100} = g_{210} \sqrt{2/2.65}$ y $g_{100} = g_{310} \sqrt{2/3.6}$ y los valores de g_{100} obtenidos son 1,2% y 1.5% que no difiere en demasía del valor dado anteriormente.

Paracristalinidad en el caso de la MP implica un limitado grado de orden restringido a algunas distancias intermoleculares. El desorden de la red aumenta con la distancia intermolecular siendo proporcional a \sqrt{N} donde N es el número de vectores intermoleculares dentro del paracristal. De aquí que los paracristales no pueden tener un tamaño ilimitado a causa de que al aumentar el número N de planos reticulares la fluctuación aumenta. El tamaño de los dominios $D_{hkl} = N \bar{d}_{hkl}$ se refiere a la extensión de la estructura sobre la cual la fluctuación entre planos alcanza el valor de la separación entre planos.

Matemáticamente esta relación entre número de planos N y fluctuación g viene dada por la ley empírica de α^* :

$$\alpha^* = \sqrt{N} g \quad |1|$$

dónde α^* es una constante que varía entre 0.1 y 0.2 para diversos materiales.

En el caso de la MP obtenemos para α^* a partir de los valores de N y g en la dirección $[100]$ el valor 0.06. En la dirección $[210]$ $\alpha^* = \sqrt{N} g/2$ se obtiene el valor 0.075 y en la $[310]$ donde $\alpha^* = \sqrt{N} g/3$ se obtiene 0.09. El valor promedio $\alpha^* = 0.08 \approx 0.1$ muestra que también es este caso hay un límite en el número de planos que difractan coherentemente de acuerdo con esta ley empírica.

Teniendo disposiciones intermoleculares más desordenadas que las que existen en el estado cristalino, las estructuras para -

cristalinas son presumiblemente más reactivas. Así pensamos que esta estructura en la MP está relacionada con la eficacia en el desarrollo de su función de transporte de protones entre ambos lados de la membrana.

Las distorsiones pueden ser causadas en el caso de la MP por la incorporación de distorsiones conformacionales en cualquiera de las tres dimensiones espaciales de la molécula de proteína y/o a través de un empaquetamiento irregular de proteínas y lípidos.

4.2.2. Distorsiones de empaquetamiento

El espaciado en la dirección meridional en membranas de MP orientadas presenta variaciones que oscilan entre 48 y 53 Å. Henderson (2) fué el primero que describió esta variación y la atribuye a diferentes distancias de contacto entre membranas adyacentes dentro del empaquetamiento.

La presencia de sólo tres órdenes de periodicidad con espaciado $49 \frac{\text{Å}}{h}$ (con $h=1,2,4$) y el aumento de su anchura integral al aumentar el orden, sugiere un empaquetamiento imperfecto de membranas que puede ser descrito satisfactoriamente usando el concepto de paracristal. Estudios de este tipo se han realizado en otras membranas biológicas, tales como la membrana del eritrocito humano (19), membrana de la mielina del nervio (20-21) y membrana de mitocondria (22) mostrando la ventaja de este tipo de tratamiento al permitir separar la información concerniente a la celdilla unidad de la referente a la red.

En la MP a partir de la representación $\delta\beta-h^2$ que puede observarse (Fig. 12, Cap.3) hemos calculado los valores de $N=14$, $g=4.5\%$

$D=680$ y $\alpha^*=0.17$. Es de notar que los valores de la fluctuación entre membranas g y la longitud de los dominios que difractan coherentemente D , son del mismo orden de magnitud que los detectados en otras membranas modelo (24,25). El valor $N=14$ es consistente con el valor de la función Q , calculada independientemente, la cual se iguala a cero después de 14 periodos (Cap. 3, fig. 13) lo que corresponde a empaquetamientos de 14 unidades. La ley empírica de α^* también se mantiene en esta ocasión.

Hinchamos capas de membranas en una atmósfera al 100% de humedad durante 25h resultando entonces que la distancia entre membranas aumenta hasta 53.2 \AA sugiriendo que ocurre un pequeño efecto de hidratación. Paralelamente a este aumento en el espaciado hemos observado, en la anchura integral de esta periodicidad, un aumento que va desde $1.9 \times 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$ a $2.7 \times 10^{-3} \text{ \AA}^{-1}$. Este resultado indica que la penetración de pequeñas cantidades de agua entre membranas adyacentes es suficiente para provocar una disminución en la longitud de los dominios que difractan. La ley $\alpha^*=g N^{\frac{1}{2}}$ ya nos anticipa que cuanto menor es D , mayores serán las distorsiones g a lo largo del paquete de membranas. De hecho usando las ecuaciones $[1-|34|]$ y $4-|1|]$ se deduce un valor de $N=9$ y $g=6\%$ para MP hinchada, evidenciando un claro aumento de las fluctuaciones entre membranas.

4.3. Distribución de BR en la MP

Los modelos presentados de ordenación de BR en la MP (Cap. 3.2) dan una interpretación razonable de los espaciados y de la distribución de intensidad que aparece en la dirección ecuatorial en el diagrama de difracción. Los cálculos realizados parecen favorecer el modelo de empaquetamiento compacto de tres proteínas en los vértices de una red hexagonal (Cap. 3, Fig. 7). Esto no es concluyente debido a las distorsiones que hemos visto existen en el empaquetamiento y que pueden modificar los resultados. Por otra parte los cálculos realizados no excluyen totalmente la posibilidad de existencia de un hueco o poro ocupado por lípidos, entre las proteínas que forman el trímero. Las posiciones de los máximos calculadas con uno y otro modelo se mantienen en los dos casos con pequeñas desviaciones y la relación de intensidades aunque favorece el modelo de empaquetamiento compacto, en el caso del máximo centrado a 0.65 \AA^{-1} se ajusta mejor al considerar un canal de 5.5 \AA de radio entre las proteínas en el trímero.

En el tercer modelo que se presenta (Cap. 3.2) se parte de la estructura del monómero, molécula de BR, y de acuerdo con Engelmann y Henderson (26,25) se le considera formado por 7- α -hélices dispuestas perpendicularmente al plano de la membrana, agrpadas en trímeros en los vértices de una celdilla hexagonal. En este caso la distribución de intensidad en el diagrama de difracción se ajusta bien hasta 0.15 \AA^{-1} con la excepción de la reflexión 430 que aparece a 0.11 \AA^{-1} cuya fuerte intensidad todavía no se ha explicado a que hechos estructurales responde.

La estructura de una α -hélice puede representarse en prime

ra aproximación por un cilindro sólido o varilla (28), esta aproximación puede parecer algo drástica sobre todo teniendo en cuenta que en la proteína los segmentos α -hélice no están desconectados entre sí, sino ligados mediante la cadena de polipéptidos que constituye el esqueleto de la proteína y contribuye indudablemente a que la diferencia de densidad electrónica entre los segmentos α -hélice y el medio entre segmentos se reduzca. Demuestra sin embargo su validez al considerar la organización de α -hélices en el monómero y observar que la función intensidad calculada en este caso presenta sólo un máximo a 10 \AA , y su perfil ajusta perfectamente el halo experimental centrado a este espaciado.

Los cálculos realizados apoyan la idea de BR formada por 7- α -hélices que se extienden perpendicularmente al plano de la membrana, idea todavía en discusión (29) pues las proteínas de membrana como grupo, tienden a tener una estructura más irregular. Sería de esperar, sin embargo, a causa de esta estructura helicoidal, la aparición de estratos en el diagrama de difracción. Lo que se observa es una fuerte intensidad en la región ecuatorial y una ausencia de intensidad casi total en las regiones superior e inferior de esta banda. El desorden existente en la dirección perpendicular al plano de la membrana puede ser una explicación a esta ausencia de intensidad en los cuadrantes del diagrama.

4.4. Perfil de densidad electrónica de la MP

La aplicación del método iterativo de ajuste de la función Q_{exp} usando funciones gaussianas sirve para determinar características estructurales a resolución baja y media. Los detalles más finos que pueden observarse dependen de b_{max} el punto para el cual se anula la intensidad difractada. La resolución viene dada por $\Delta x = 1/2b_{max}$ y suele estar entre 8 y 25 Å según el espaciado al que aparezcan las últimas reflexiones, siendo en el caso de MP de 12 Å. No puede esperarse de este método que sirva para determinar posiciones atómicas, tan sólo detalles tales como espesor de las membranas, estratos de proteína o grupos de cabezas polares de la bicapa lipídica, es decir, sólo se puede resolver el perfil de densidad electrónica de regiones características de la membrana.

Un efecto destacado del método empleado es la redistribución del contenido de información del perfil de intensidad durante el proceso de la transformación de Fourier. La parte de información concerniente a la estructura de la celdilla unidad se concentra en el intervalo más interno de la función Q_{exp} , intervalo en el cual se refina el modelo propuesto. Otras ventajas de este ajuste es que el intervalo de muestreo de la función Q_{exp} puede reducirse tanto como se quiera sin influenciar negativamente el proceso de aproximación como ocurre en otros casos (30,31) y que las distorsiones que ocurren en el empaquetamiento son tenidas en consideración y cuantificadas.

El principal problema que se plantea al usar este método es el de la unicidad de la solución. Siempre que se usa el método de la función Q se obtienen dos soluciones $\rho_0(x)$ y $\rho_0(-x)$ debido a

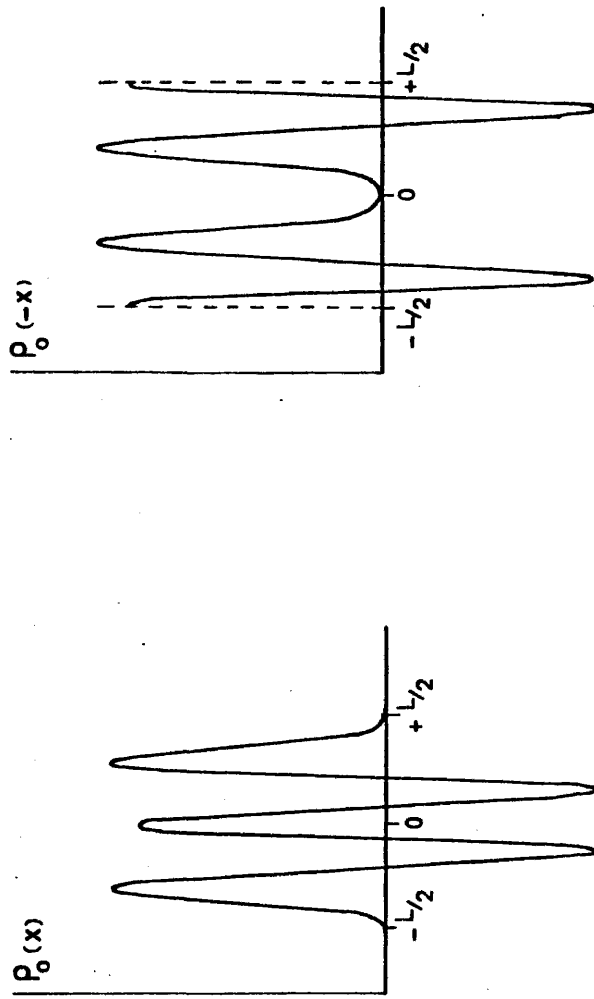


Fig. 1

que su cuadrado de convolución es el mismo, dando funciones Q idénticas (11). La Fig. 1 muestra $\rho_0(x)$ y $\rho_0(-x)$ para el caso de MP (cap. 3, Fig. 14). Esta indeterminación es inherente al método y físicamente corresponde a la translación del origen de la celdilla unidad al espacio intermembranas. La elección entre estas dos estructuras $\rho_0(x)$ y $\rho_0(-x)$ se hace atendiendo a factores relevantes funcionales dando preferencia a la estructura positiva. En nuestro caso y debido al método de desconvolución empleado al ajustar la función Q_{exp} en el intervalo $0 \leq x \leq L$ tenemos el hecho de que hay dos conjuntos de parámetros con los cuales puede aproximarse. La elección de una solución (Cap. 3, Fig. 14) se ha hecho en base no sólo al mayor grado de aproximación dado por $R_q = 0.002$ sino también debido a que el valor de la fluctuación paracristalina obtenida con este modelo $g = 6.9\%$ se acerca considerablemente al valor obtenido independientemente en la representación $\delta\beta$ frente a b^2 que nos da $(4.5 \pm 0.7)\%$ siendo en la cota de error de 5.2% . Por otro lado este valor de g es del orden del obtenido en otras membranas como es el caso de la membrana de la mielina (32) para la cual el valor $g = 4\%$, también en membranas modelo de cerebrósidos (24) se ha obtenido para g el valor $4,2\%$. Frente a esto la solución que se presenta en la Fig. 15, Cap. 3, nos da un valor de $g = 10\%$ al mismo tiempo que un valor de $R_q = 0.005$ mayor que el anterior. Mas que una decisión final de si uno de los perfiles dados en el Cap. 3.3. en la solución correcta al perfil de densidad de la MP, pensamos que lo que tienen en común ambos perfiles si debe ser característico de la membrana. Así la existencia de una estructura de bicapa en la membrana parece fuera de dudas razonables. En ambos casos se observa un perfil con tres picos de signo positivo y dos de signo negativo. La distancia entre los picos más externos

correspondiente a la separación de los grupos de cabezas polares de los lípidos en la bicapa es en ambos casos de 42 \AA . La amplitud del pico interior puede variar entre los considerados en las Figs. 14 y 15 del Cap. 3 pero de cualquier manera demuestra que existe una contribución importante en la región central de la membrana y según experimentos de localización bioquímica (33) actualmente se piensa que existen cantidades de proteína en el interior de la membrana, esto es que la proteína atraviesa la membrana. También en ambos casos la anchura del perfil es de 70 \AA y la función de $Q_0(x)$ se anula a esta distancia lo que indica que el espesor de la membrana es de ese orden. La distancia de empaquetamiento 50 \AA sería explicable en tonces de acuerdo con Blaurock (34) debido a que las proteínas que sobresalen de la bicapa lipídica en membranas vecinas se entrecruzan en el proceso de empaquetamiento dando lugar a esta disminución del espaciado en el diagrama de difracción.

REFERENCIAS

1. Blaurock, A.E., Stoeckenius, W., *Nature New Biology*, 223, 152 (1971)
2. Henderson, R., *J. Mol. Biol.*, 93, 123 (1975)
3. Blaurock, A.E., *J. Mol. Biol.*, 93, 139 (1975)
4. Blaurock, A.E., *Science*, 196, 1101 (1977)
5. Crick, F.H.C., *Nature*, 170, 882 (1952)
6. Crick, F.H.C., *Acta Cryst.*, 6, 689 (1953)
7. Pauling, L., Corey, R.B., *Nature*, 171, 59 (1953)
8. Worthington, C.R., Khare, R.S., *Biophys. J.*, 23, 407 (1978)
9. Levine, Y.K., Wilkins, M.H.F., *Nature New Biology*, 230, 69 (1971)
10. Wilkins, M.H.F., Blaurock, A.E., Engelmann, D.M., *Nature New Biology*, 230, 72 (1971)
11. Hosemann, R., Bagchi, S.N., "Direct Analysis of Diffraction by Matter", North-Holland Publishing Company. Amsterdam (1962)
12. Hosemann, R., *CRC Critical Rev. Macromol. Sci.*, Oct., p.351(1972)
13. Cervinka, L., Hosemann, R., Vogel, W., *Acta Cryst.* A26, 277 (1970)
14. Steffen, B., Hosemann, R., *Phys. Rev.*, B13, 3232 (1976)
15. Hosemann, R., Dreissig, W., Nemetscheh, J., *Mol. Biol.*, 83, 275 (1974)
16. Pape, E.H., Kreutz, W., *J. Appl. Cryst.*, 11, 421 (1978)
17. Hosemann, R., Wilke, W., Baltá Calleja, F.J., *Acta Cryst.*, 21, 118 (1966)
18. Martinez Salazar, J., Baltá Calleja, F.J., *J. Crystal Growth*, 42(2), 163 (1980)
19. Pape, E.H., Klott, K., Kreutz, W., *Biophys. J.*, 19, 141 (1977)
20. Gbordzoe, M.K., Kreutz, W., *Z. Naturforsch.*, 33C, 184 (1978)
21. Blaurock, A.E., Nelander, J.C., *J. Mol. Biol.*, 103, 421 (1976)

22. Müller-Klieser, W., Kreutz, W., Z. Naturforsch., 13C, 612 (1976)
23. Hosemann, R., Loboda-Cacković, J., Cacković, H., Fernández Bermúdez, S., Baltá Calleja, F.J., Z. Naturforsch., 34C, 1121 (1979)
24. Fernández Bermúdez, S., Loboda-Cacković, J., Cacković, H., Hosemann, R., Z. Naturforsch., 32C, 362 (1977)
25. Engelmann, D.H., Zaccai, G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5894 (1980)
26. Engelmann, D.H., Henderson, R., MacLachlan, A.D., Wallace, B.A., Proc. Natl. Acad. USA, 77, 2023 (1980)
27. Khan, S., Anderson, S., Gogol, E., Rewkella, J., Zaccai, G., Engelmann, D.H., Biophys. J., 33, 173a (1981)
28. Vainshtein, B.K., "Diffraction of X-Rays by chain Molecules", Elsevier Publishing Co., Amsterdam (1966)
29. Glaeser, R.M., Jap, B.K., Maestre, M.F., Hayward, S.B., Biophys. J., 33, 218a (1981)
30. Kreutz, W., Habilitationsschrift D 83, Technische Universität Berlin (1968)
31. Lesslauer, W., Blasie, J.K., Biophys. J., 12, 175 (1972)
32. Gbordzoe, M.K., Kreutz, W., J. Appl. Cryst., 11, 489 (1978)
33. Bridgen J., Walker J.D., Biochemistry, 15, 792 (1976)
34. Blaurock, A.E., King, G.I. Science, 196, 1101 (1976)

131

5. CONCLUSIONES



BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

- Las moléculas de proteína BR están empaquetadas según una celdilla hexagonal de dimensiones $a = 61.45$ y $c = 48.9 \text{ \AA}$ que contiene tres moléculas por celdilla unidad.

- Hemos encontrado cuatro nuevas reflexiones en la dirección ecuatorial con espaciados $6.81, 6.65, 6.51, 6.05 \text{ \AA}$; los índices asignados a estas reflexiones son 540, 800, 720 y 640 respectivamente.

- La membrana Púrpura se comporta como un Paracrystal. El parámetro de fluctuación entre planos cristalográficos g en las direcciones $[100]$ y $[001]$ es 1.5% y 4.5% respectivamente. En consecuencia el número de planos N que difractan coherentemente en estas direcciones cristalográficas es 16 y 14.

- El hinchamiento de la MP provoca un aumento de la paracrystalinidad en la dirección $[001]$. Los valores encontrados son $g = 6\%$ y $N = 9$.

- Los vértices de la celdilla hexagonal vienen ocupados por tres moléculas de proteína. El perfil de intensidad calculado a partir de este modelo ajusta satisfactoriamente el perfil de intensidad en la dirección ecuatorial.

- En el análisis de la posición e intensidad del halo que aparece a 10 \AA lo hemos correlacionado con la distancia promedio entre los siete segmentos de α -hélice de la molécula.

- El análisis de la intensidad en la dirección meridional nos ha permitido calcular el perfil de intensidad electrónica. Las dos soluciones obtenidas nos proporcionan una distancia entre grupos de cabezas lipídicas de 42 \AA y un espesor de membrana de 70 \AA . La parte interior del perfil de densidad indica claramente que las moléculas de proteína atraviesan el plano de membrana.